

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt
Gastroenterologie und Stoffwechsel

Direktor: Prof. Dr. med. T. M. Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Charakterisierung neuer Zielgene im Pankreaskarzinom



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Anja Krattenmacher
aus Biberach an der Riß

Marburg, 2015

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
28.04.2015**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr PD Dr. M. Buchholz

1. Korreferent: Herr Dr. M. Lauth

„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Charakterisierung neuer Zielgene im Pankreaskarzinom.....	
Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
1.1. Das Pankreaskarzinom.....	1
1.1.1. Epidemiologie und Klinik des Pankreaskarzinoms	1
1.1.2. Molekulare Entwicklung des Tumors.....	2
1.2. Der RNA-Interferenz-Screen (RNAi-Screen).....	4
1.2.1. Das System der RNA Interferenz	4
1.2.2. Der Barcode-RNAi-Screen.....	5
1.3. Das Kandidatengen SMC2 (CAP-E)	7
1.3.1. Condensin I.....	9
1.3.2. Condensin II.....	9
1.3.3. Tumorrelevanz von SMC2	9
1.4. Das Kandidatengen USP5 (ISO-T)	10
1.5. Ziel der Arbeit	12
2. Material	13
2.1. Geräte	13
2.2. Chemikalien.....	14
2.3. Verbrauchsmaterialien.....	16
2.4. Verwendetet Kits.....	18
2.5. Antikörper für Westernblot	18
2.6. Enzyme	19
2.7. Oligonukleotidsequenzen.....	20
2.7.1. Primer für qRT-PCR.....	20
2.7.2. siRNA Sequenzen.....	21
2.7.3. Klonierungsoligonukleotide	21
2.8. Zelllinien	22

2.9. Plasmid.....	22
2.10. Lösungen.....	23
2.10.1. DNA/RNA-Ladepuffer	23
2.10.2. Enzympuffer.....	23
2.10.3. Kompetente Bakterien	23
2.10.4. MTT-Solubilisierungslösung.....	24
2.10.5. Zellkultur	24
2.10.6. Westernblot.....	24
3. Methoden	26
3.1. Molekularbiologische Arbeiten	26
3.1.1. Arbeiten mit <i>E. coli</i>	26
3.1.2. Arbeiten mit Plasmid-DNA	27
3.1.3. Arbeiten mit Zellen und Geweben	29
3.2. Methoden der Zellkultur	33
3.2.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen	33
3.2.2. Kultivieren von Zelllinien	34
3.2.3. Transfektionen von Zelllinien	34
3.2.4. Behandlung der Stablen shRNA-Populationen mit Doxycyclin	35
3.2.5. Die Behandlung der Zellen mit MG132 und Cycloheximid.....	35
3.2.6. Vitalitäts-Assay (MTT).....	35
3.2.7. Proliferations-Assay (BrdU).....	36
3.2.8. Analyse des Wachstums ohne Anheftung (Soft-Agar-Assay).....	36
3.2.9. <i>Time-Lapse</i>	37
3.2.10. Durchflusszytometrie (Zellzyklusanalysen).....	37
3.2.11. Virusproduktion in HEK293T	37
3.2.12. Transduktion und Selektion von Zellen	38
3.3. RNAi-Screen.....	38
3.4. Mausversuche	38
3.5. Statistische Auswertung.....	39
4. Ergebnisse	40

4.1.	Der shRNA-Screen	40
4.2.	Die Validierung des shRNA-Screens	42
4.3.	Das Gen <i>SMC2</i>	44
4.3.1.	<i>SMC2</i> ist essentiell für die Proliferation und Vitalität von Pankreaskarzinomzellen 44	
4.3.2.	<i>SMC2</i> hat keinen Einfluss auf die Mobilität der Zellen.....	47
4.3.3.	<i>SMC2</i> hat einen moderaten Einfluss auf den Zellzyklus.....	48
4.3.4.	DNA-Brüche führen zur Aktivierung von <i>p21/CDKN1A</i> und Apoptose.....	49
4.3.5.	<i>SMC2</i> wird durch <i>WNT5A</i> reguliert	50
4.3.6.	<i>SMC2-Knockdown</i> reduziert das Tumorwachstum <i>in vivo</i>	51
4.4.	Das Gen <i>USP5</i>	53
4.4.1.	<i>USP5</i> ist essentiell für die Proliferation und Vitalität von Pankreaskarzinomzellen 53	
4.4.2.	<i>USP5</i> beeinflusst den Zellzyklus	56
4.4.3.	DNA-Brüche führen zur Aktivierung von <i>p21/CDKN1A</i> und Apoptose.....	57
4.4.4.	<i>USP5</i> reguliert über eine <i>p27/CDKN1B</i> Modifikation die Ubiquitinierung und den Proteinabbau.....	58
4.4.5.	<i>USP5-Knockdown</i> reduzierte das Tumorwachstum <i>in vivo</i>	62
5.	Diskussion.....	64
5.1.	<i>SMC2</i> und die Rolle im Pankreaskarzinom.....	64
5.1.1.	Die Aufklärung der Rolle von <i>SMC2</i> im Pankreaskarzinom.....	64
5.1.2.	Aufklärung der mechanistischen Hintergründe des <i>SMC2 Knockdowns</i>	65
5.2.	<i>USP5</i> und die Rolle im Pankreaskarzinom.....	67
5.2.1.	Die Aufklärung der Rolle von <i>USP5</i> im Pankreaskarzinom	67
5.2.2.	Aufklärung der mechanistischen Hintergründe des <i>USP5 Knockdowns</i>	68
5.3.	Ausblick	70
6.	Zusammenfassung	73
6.1.	Deutsch	73
6.2.	Englisch.....	75
7.	Literaturverzeichnis	76

8. Tabellenverzeichnis	86
9. Abbildungsverzeichnis	87
10. Abkürzungsverzeichnis.....	89
11. Verzeichnis der Akademischen Lehrer	93
12. Danksagung	94

1. Einleitung

1.1. Das Pankreaskarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Klinik des Pankreaskarzinoms

Das duktales Pankreas Adenokarzinom (PDAC), ist einer der aggressivsten humanen malignen Tumoren. Die meisten Patienten mit PDAC werden erst in einem fortgeschrittenen, bereits metastasierten Stadium diagnostiziert (Cascinu et al., 2010). Die Gründe der späten Diagnose, liegen unter anderem an den fehlenden oder auch oft uncharakteristischen Symptomen wie beispielsweise Abdominal- oder Rückenschmerzen, Gewichtsverlust oder eine neu entwickelte Diabeteserkrankung (Seufferlein et al., 2012). Aufgrund dessen, ist die derzeitige Behandlung mit konventionellen Methoden, wie eine kurative Resektion, nur selten erfolgreich. In diesem Zusammenhang kann eine chronische Pankreatitis ein erster Hinweis auf eine spätere maligne Entartung sein, da für diese Patienten das Risiko einer malignen Tumorentwicklung deutlich erhöht ist (Cascinu et al., 2010). Auch eine häufige Resistenz der Tumore gegen gängige Chemotherapeutika wie Gemcitabine, erschwert eine erfolgreiche Behandlung. Aufgrund dieser Umstände, ist das Pankreaskarzinom mit einer 5-Jahresüberlebensrate von <7 %, die vierthäufigste Ursache der durch Krebs verursachten Todesfällen in der westlichen Welt (Siegel et al., 2015). In der Europäischen Union ist PDAC im Vergleich zu anderen Krebsarten auf dem Vormarsch. Sowohl die Zahl an Neuerkrankungen, als auch die Mortalität nimmt stetig zu. Die Todesrate ist bei den Männern von 7,86 pro 100.000 (Stand 2007) auf 8,0 pro 100.000 (Stand 2013) und bei den Frauen von 5,24 pro 100.000 auf 5,5 pro 100.000 gestiegen (Jemal et al., 2011, Malvezzi et al., 2013). Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren, wurde die durchschnittliche Überlebenszeit von etwa 6 Monaten kaum überschritten. Deshalb ist es notwendig, neue therapeutische Ansätze gegen diese Krankheit zu finden.

1.1.2. Molekulare Entwicklung des Tumors

Trotz intensiver Forschung sind die Gründe für die Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms weiterhin im Unklaren. Bisher konnten nur die Faktoren „Alter“ und „Tabakkonsum“ als äußere Einflüsse in Verbindung mit der Tumorentstehung gebracht werden (Hidalgo, 2010).

Aufgrund der erarbeiteten Forschungsdaten kann davon ausgegangen werden, dass die Akkumulation verschiedener Genmutationen eine Entstehung des Karzinoms hervorruft (Li et al., 2004). In den meisten Fällen, liegt der Ursprungsort im exokrinen Teil des Pankreas. Es bilden sich nicht-invasive Vorläuferstadien, die intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMNs), muzinös-zystischen Neoplasien (MCNs) und „pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs)“. Während der Entwicklung der Neoplasien verändern sich der Aufbau und die Funktion der Epithelzellen des Pankreas. Alle drei Läsionen führen zu einem erhöhten Tumorrisiko, da sich aus ihnen ein invasives Karzinom entwickeln kann (Hruban et al., 2007, Maitra et al., 2005).

Die meisten Adenokarzinome des Pankreas gehen aus den nicht-invasiven PanINs hervor (Brugge et al., 2004, Hruban et al., 2008). PanINs treten verstärkt im Alter oder bei einer chronischen Pankreatitis auf und werden in 3 Stadien eingeteilt, PanIN-1a (intraepithelialer Typ) und 1b (intraduktaler Typ), 2 und 3 (Abbildung 2-1 B) (Maitra et al., 2005, Scarlett et al., 2011). Die Entwicklung des invasiven Karzinoms, geht in der Regel mit der Kumulation mehrere Mutationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einher. Bis zu 90 % aller Erkrankten haben eine Mutation im *KRAS*-Gen, welche zur Aktivierung des Gens führt (Lohr et al., 2000). Mutationen im Proto-Onkogen *KRAS* sind häufig bereits in PanIN 1 Läsionen nachweisbar. *KRAS* ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Durch die Mutation ist das Protein dauerhaft aktiv, woraus eine gesteigerte Zellproliferation resultiert (Ji et al., 2009). Weitere Mutationen, wie die Inaktivierung des Tumorsuppressors *p16/CDKN2A*, ermöglichen der Zelle das Überspringen des G1/S Phasen Checkpoints und tragen damit zusätzlich zur unkontrollierten Proliferation bei. Bereits im zweiten Stadium der PanIN Läsionen kann die Inaktivierung von *p16/CDKN2A* nachgewiesen werden (Borg et al., 2000). Eine zusätzliche Mutation im Tumorsuppressor *TP53* ermöglicht der Zelle zelleigene Reparaturmechanismen zu umgehen und dadurch apoptotische Signale zu verhindern. In etwa 50 % der Pankreaskarzinome ist *SMAD4*, ein Gen des TGF β Signalweges mutiert, welches dazu führt, dass der wachstumshemmende Effekt des Signalweges in der Zelle nicht mehr zur Wirkung kommt und zum Wachstumsvorteil der Zelle wird (Bardeesy et al., 2006, Levy and Hill, 2005, Cowan and Maitra, 2014).

Neben diesen gut erforschten Mechanismen der Pankreaskarzinogenese, gibt es weitere Mutationen und Veränderungen, die für die Differenzierung und die Resistenzbildung verantwortlich sind. Häufig betroffene Signalwege sind beispielsweise der WNT-, NOTCH- oder der EGF Signalweg (Ardito et al., 2012, Niess et al., 2014).

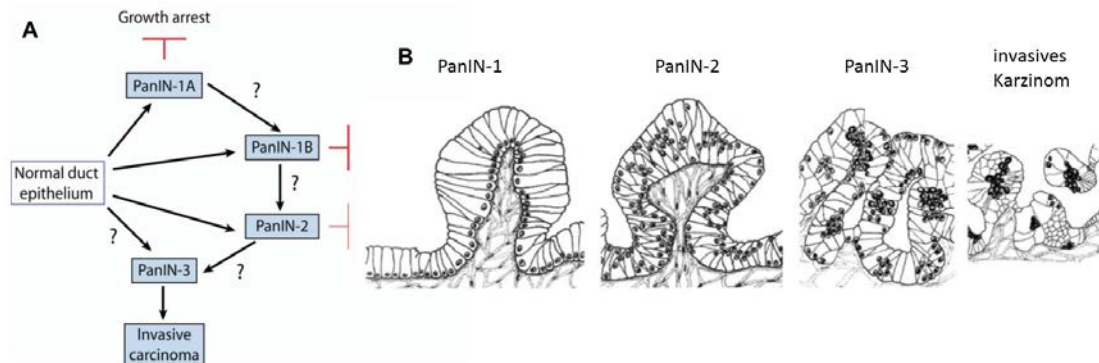


Abbildung 1-1 Entstehung des invasiven PDAC aus gesundem Pankreasgewebe über die PanIN-Vorstufen.

(A) Aktuelles, schematisches Modell der möglichen Wege, die zur Entwicklung des PDAC führen können. (B) Schematische histologische Modelle der verschiedenen Läsionen. (Quelle: Real, 2003, Real et al., 2009)

Aktuell sind Zweifel an der klassischen Entwicklung des PDAC aufgekommen. Nach dem bisherigen Verständnis, entwickelt sich das Pankreaskarzinom nach einer Mutation im *KRAS*-Gen über linear aufeinander folgende Vorläuferstufen (PanIN 1 bis 3), durch die Anhäufung von weiteren Mutationen, bis hin zum Karzinom. In einem alternativen Modell, führt in bereits mutierten duktaalen Zellen, das Auftreten der zusätzlichen *KRAS*-Mutationen zu Dysplasien mit unterschiedlichen Schweregraden. Damit ist es auch möglich, dass sich aus PanIN-1 direkt die PanIN-3 Läsion entwickelt. Weiterhin kann direkt aus PanIN-2 ein malignes Karzinom entstehen, unabhängig davon, ob eine PanIN-3 Vorstufe existierte (Abbildung 1-1 A) (Real, 2003, Real et al., 2008).

Ein weiteres Charakteristikum des invasiven Pankreaskarzinoms, ist die ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion (Neesse et al., 2011). Als Stroma, wird das extrazelluläre und zelluläre Geflecht bezeichnet, welches mit dem Tumor interagiert und ihn umgibt. Es besteht aus einer Interaktion der Tumorzellen mit Fibroblasten, myo-Fibroblasten, pankreatischen Sternzellen, Immunzellen, Blutgefäßen, extrazellulärer Matrix und gelösten Proteinen wie Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Das Stroma kann bis zu 90 % der Tumormasse ausmachen und verändert sich in seiner Zusammensetzung stetig während der Tumorentwicklung (Feig et al., 2012). Als desmoplastische Reaktion wird die Proliferation des fibrotischen Bindegewebes bezeichnet (Apte et al., 2004). Das Stroma beeinflusst das Tumorwachstum, dessen invasives Potential und die Metastasierung (Vonlaufen et al., 2008). Die Funktion des

Stromas ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Zwar konnte gezeigt werden, dass das Stroma unterstützend und fördernd auf den Tumor einwirkt (Hwang et al., 2008), jedoch gibt es auch Daten, die belegen, dass eine Verletzung des Stromas mittels ionisierender Strahlung, zu einer erhöhten Invasion des Tumors beiträgt (Milas et al., 1988, Ohuchida et al., 2004). Die Proteine, die sich im Stroma befinden, können für die Prognose des Krankheitsverlaufs herangezogen werden und begünstigen die Resistenzen des Tumors gegen eine medikamentöse Behandlung. Durch das dichte Stromagewebe ist die Vaskularisierung des Pankreastumors schlecht ausgeprägt, wodurch kurzlebige Zytostatika nicht in ausreichender Konzentration an die Tumorzellen gelangen um den Tumor zu schädigen (Olive et al., 2009, Xu et al., 2014).

1.2. Der RNA-Interferenz-Screen (RNAi-Screen)

1.2.1. Das System der RNA Interferenz

Die RNA Interferenz (RNAi), ein spezifisches Genrepressionssystem welches durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelöst wird, wurde erstmals in *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Fire et al., 1998). RNAi ist ein natürliches System, welches sowohl in Pilzen, als auch in Pflanzen und Tieren nachgewiesen wurde (Hammond et al., 2001). Die mRNA Degradierung oder Inhibition erfolgt dabei über 21 bis 23 lange dsRNA-Nukleotide (Tuschl et al., 1999, Zamore et al., 1999). Nur wenige Jahre nach der Entdeckung der RNAi zeigten zwei Arbeitsgruppen, dass durch die Transfektion von dsRNA in tierische Zellen eine spezifische Genrepression erreicht werden kann (Caplen et al., 2001, Elbashir et al., 2001a). Die RNA Interferenz kann durch RNA Moleküle unterschiedlicher Herkunft ausgelöst werden, beispielsweise durch RNA Viren, Transposons, exogene dsRNAs (siRNAs, shRNAs) und endogene dsRNA (miRNAs) (Rana, 2007).

1.2.1.1. Exogene dsRNA

Exogene dsRNAs lösen die RNA-Interferenz durch kleine 21-23 Nukleotide (nt) lange dsRNA Fragmente mit 2-nt Überhänge am 3' Ende und einer Phosphatgruppe am 5' Ende aus (Meister and Tuschl, 2004). Während siRNAs bereits in dieser Form in die Zelle transfiziert wird, muss bei shRNAs mittels Dicer, einem RNase III Enzym, der

Hairpin entfernt werden (Carmell and Hannon, 2004, Hannon and Rossi, 2004). Studien konnten zeigen, dass shRNAs eine stärkere Genrepression auslösen als siRNAs (Gregory et al., 2005, Kim et al., 2005, Siolas et al., 2005). Der Antisense Strang der siRNA, auch „*guide strand*“ genannt, dient als Vorlage für die sequenzspezifische Genrepression durch die RNAi-Maschinerie (Rana, 2007). Die siRNA bindet dabei an RISC (*RNA induced-silencing complex*, bestehend aus Dicer, den Argoproteinen Ago1 und Ago2, TRBP und dem dsRNA-bindenden Protein PACT) und bildet einen RNA-Protein Komplex (siRISC) (Filipowicz, 2005), der den *guide strand* beinhaltet (Schwarz et al., 2003, Khvorova et al., 2003). siRISC bindet anschließend an die Ziel-mRNA, die durch Ago2 gespalten wird (Meister et al., 2004, Liu et al., 2004, Song et al., 2004). Durch das 5'Ende des *guide strands* wird die Spaltstelle, die sich zwischen dem Nukleotid 10 und 11 befindet, definiert (Abbildung 1-2) (Elbashir et al., 2001b).

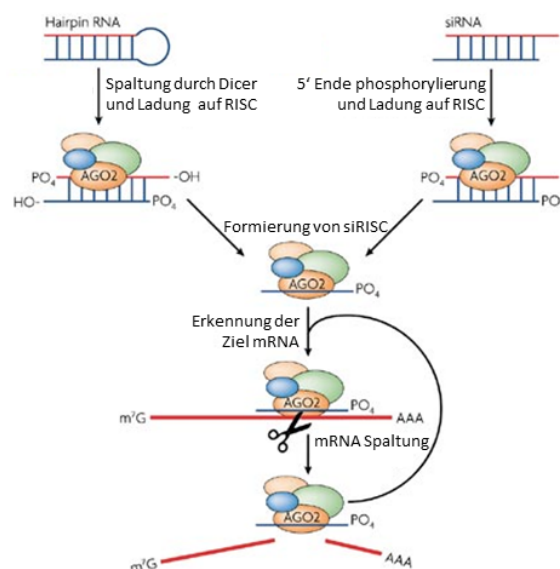


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der RNA Interferenz

Dargestellt sind die shRNA und siRNA, die auf den RISC geladen werden. Der dadurch geformte siRISC erkennt die Ziel-mRNA, die dann durch Argonout2 gespalten wird. (Quelle: verändert nach Rana 2007)

1.2.2. Der Barcode-RNAi-Screen

shRNA-Bibliotheken ermöglichen einen gezielten *Knockdown* von tausenden verschiedenen Genen, und damit die funktionelle Analyse des ganzen Transkriptoms, durch „*loss of function*“ Studien. Eine virale Integration und die daraus resultierende stabile Expression der spezifischen shRNA führt zu einer permanenten Reduktion des spezifischen Zielgens in der Zelle (Berns et al., 2004, Bernards et al., 2006).

Durch einen molekularen Marker im verwendeten Vektor, können Informationen über die Identität des jeweiligen Vektors bereitgestellt werden. Als Molekulare Marker werden *full-length hairpins*, *half hairpins* oder externe Barcodes verwendet (Berns et al., 2004, Schlabach et al., 2008, Brummelkamp and Bernards, 2003). Für die Identifizierung des molekularen Markers wird er zuerst durch eine PCR amplifiziert und anschließend entweder sequenziert oder für eine Microarray-Hybridisierung markiert (Schlabach et al., 2008, Boettcher et al., 2010). Während es beim *full-length* oder *half hairpin*-Marker durch die Möglichkeit des Self-Annealing zu Problemen während der PCR Amplifikation und Hybridisierung kommen kann, liegt der Vorteil der externen Barcodes in seiner nicht komplementären Natur (Boettcher and Hoheisel, 2010).

Large scale shRNA Expressionsvektor-Bibliotheken mit Barcode-Marker bieten die Möglichkeit, einen Screen in einer einzigen Zellschale durchzuführen und zu analysieren, anstelle eines individuellen Knockdowns im Array-Format (Brummelkamp and Bernards, 2003). Dieser Screen basiert auf dem Prinzip, dass in jeder Zelle nur ein shRNA-Vektor integriert, der ein Gen spezifisch reprimiert. Die markierten Vektoren der Referenz und Testpopulation werden für die Identifizierung mittels PCR amplifiziert, sequenziert und anschließend werden beide Bedingungen miteinander verglichen. Konstrukte, deren shRNA Gene reprimieren, die für das Überleben der Zelle notwendig sind, verarmen in der Testkultur, während Konstrukte, deren shRNA der Zelle einen Überlebensvorteil bieten, angereichert werden (Abbildung 1-3) (Boettcher and Hoheisel, 2010).

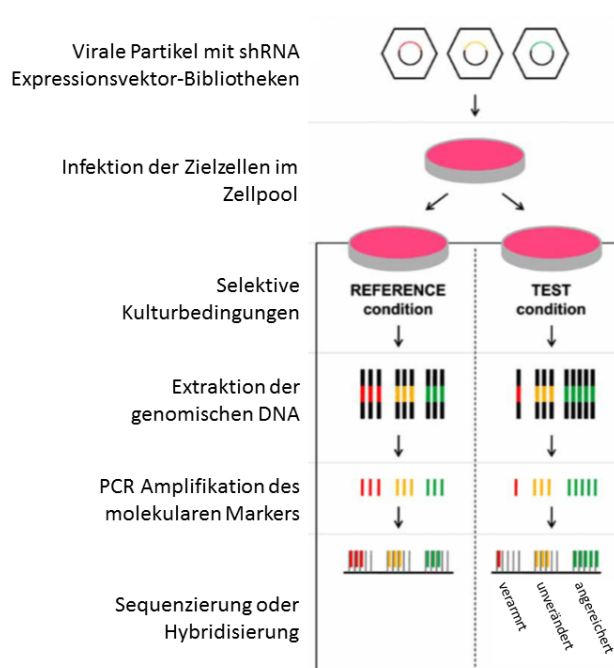


Abbildung 1-3 schematische Darstellung des gepoolten RNAi-Screen.
(Quelle: verändert nach Boettcher and Hoheisel, 2010)

Genetische und epigenetische Veränderungen führen zur funktionellen Deregulation von verschiedenen Signalwegen, die wiederum zur Karzinogenese beitragen (Vogelstein et al., 2013). Diese fehlregulierten Signalwege können für eine gezielte Anti-Krebs-Therapie durch kleine Moleküle oder Antikörper genutzt werden, indem kritische Knoten in dem Signalweg inhibiert werden. Am häufigsten werden Enzyme oder Kinasen als Zielstrukturen zur Behandlung im Menschen verwendet (Patel et al., 2013, Vogelstein et al., 2013). Jedoch eignen sich nicht alle Proteine als Angriffspunkt, da genetische Mutationen oder Deletionen nicht immer von kleinen Molekülen oder Antikörpern erkannt werden (Hartwell et al., 1997), wie zum Beispiel der Funktionsverlust von Tumorsuppressoren. Für andere Proteine wie RAS und c-Myc erwies es sich eine direkte Modifikation als sehr schwierig (Fang, 2014). Außerdem können funktionelle Veränderungen in nicht „*druggable Targets*“ zu Veränderungen in den Signalwegen führen, die dann wiederum Resistenzen hervorrufen können (Hartwell et al., 1997).

Die RNAi-Screening-Technologie ermöglicht eine Identifikation von genetischen Abhängigkeiten in Tumorzellen (Schlabach et al., 2008) und somit neue Möglichkeiten für Therapieansätze oder dient der Aufklärung von zellulären Wirkungen von Medikamenten. Dadurch können Therapiemöglichkeiten mit weniger Nebenwirkungen entwickelt werden (Nijman, 2011). Im Idealfall werden vorhandene Mutationen in den Tumorzellen genutzt, um mittels eines RNAi-Screens eine synthetische Letalität hervorzurufen, die in normalen Zellen nicht auftritt.

Durch solch ein RNAi-Screening Verfahren wurden im Vorfeld dieser Arbeit zwei neue Kandidatengene indentifiziert: *SMC2* und *USP5*.

1.3. Das Kandidatengen *SMC2* (CAP-E)

Structural maintenance of chromosomes (SMC) -Proteine gehören zur Familie der DNA-bindenden ATPasen (Hirano, 2006). Sie regulieren die strukturelle und funktionelle Organisation der Chromosomen von Bakterien bis zum Menschen. In Eukaryoten sind bisher 6 SMC-Proteine bekannt (SMC1-6), die drei verschiedene Heterodimere formen (SMC1/3, SMC2/4 SMC5/6) (Losada and Hirano, 2005).

Aufbau der Homodimere

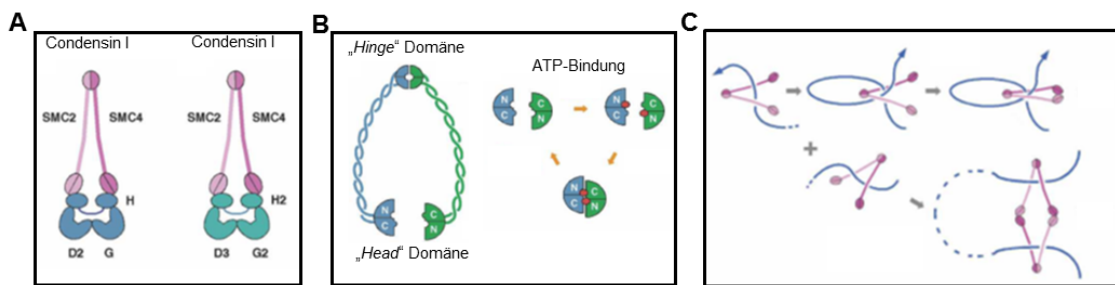


Abbildung 1-4: Aufbau und Funktion der Condensin-Komplexe

(A) Aufbau der beiden Condensin-Komplexe aus SMC2 und SMC4 mit den Untereinheiten CAP-D2 bzw. CAP-D3 (D2, D3), CAP-G bzw. CAP-G2 (G, G2) und CAP-H bzw. CAP-H2 (H, H2). Faltung von zwei SMC-Proteinen in *Hinge*- und *Head*-Domäne mit Bildung des Gelenks und V-förmige Ausrichtung. (B) Dargestellt ist die ATP-Bindung (roter Punkt) durch Hydrolyse an die N- und C-Terminale *Head*-Domäne der beiden SMC-Proteine. (C) Darstellung der möglichen Funktionsweise des Condensin-Komplexes. Schematische Darstellung der DNA Bindung der Chondensin-Komplexe als Dimer oder Tetramer. DNA Helix (blau), Condensin (hell rot). (Quelle: verändert nach Losada and Hirano, 2005)

Die etwa 1000 bis 1500 Aminosäuren großen SMC Proteine (ca. 110 - 170 kDa) haben alle einen ähnlichen Aufbau mit denselben Domänen (Harvey et al., 2002). Durch die Faltung eines antiparallelen *coiled-coil*-Motives entsteht ein etwa 50 nm großes, stabförmiges Protein mit einer ABC-ähnlichen ATP-Bindungsstelle. An einen Ende befindet sich die *head*-Domäne, und am anderen Ende ein Gelenk, die *hinge*-Domäne. Beide gefalteten SMC-Proteine assoziieren an der jeweiligen *hinge*-Domäne zu einem Gelenk und richten sich V-förmig aus (Abbildung 1-4 B) (Anderson et al., 2002, Melby et al., 1998).

Die ATPase-Domäne eines jeden SMC-Proteinkomplexes ist in vier Teile aufgeteilt, die durch die N- und C-Termini der beiden SMC-Proteine gebildet wird (Haering et al., 2004, Lammens et al., 2004). Die ATP-Bindung und Hydrolyse, ebenso wie das Binden und Lösen der *head*-Domänen, löst eine Formationsänderung aus, die zur DNA-Bindung führt (Abbildung 1-4 B) (Hirano et al., 2001).

Der Condensin-Komplex wird vom SMC2/4-Heterodimer (beim Mensch auch CAP-E und CAP-C genannt) gebildet. Condensin I und Condensin II unterscheiden sich in den regulatorischen non-SMC-Proteinen, die zur Komplexbildung notwendig sind (Abbildung 1-4 A) (Schleiffer et al., 2003). Beide Condensin-Komplexe sind an der DNA-Reparatur beteiligt. Während der Interphase ist Condensin am Nukleus assoziiert. Dadurch reguliert es unter Nährstoffmangel die Kondensation von ribosomaler DNA (rDNA). Durch diese Interaktion wird die intrachromosomale homologe Rekombination inhibiert und die Produktion von extrachromosomaler rDNA-Ringstruktur (ERC, rDNA *ring circles*) reduziert (Tsang and Zheng, 2009).

1.3.1. Condensin I

Condensin I wird durch SMC2 und SMC4, und die non-SMC-Proteine CAP-D2, CAP-G und CAP-H (Ono et al., 2003) gebildet. Durch die Interaktion mit dem PARP1-XRCC1-Komplex spielt er eine Rolle in der DNA-Reparatur von Einzelstrangbrüchen (SSB, *single strand brakes*) (Wu and Yu, 2012). Außerdem ist Condensin I in der Lage die dsDNA-Helix durch die Hydrolyse von ATP zu verdichten. Die DNA-Verdichtung ist ein dynamisches und reversibles System, in welches möglicherweise ein Loopmechanismus involviert ist (Abbildung 2-3 C) (Strick et al., 2004). Das *Supercoiling* wird durch eine CDK1-abhängige Phosphorylierung der non-SMC-Untereinheit aktiviert, was darauf hindeutet, dass es eine direkte Rolle bei der Chromosomenanordnung während der Mitose spielt (Kimura et al., 1998, Strick et al., 2004).

1.3.2. Condensin II

Durch die Untereinheiten CAP-D3, CAP-G2 und CAP-H2 wird der Condensin II-Komplex gebildet (Ono et al., 2003). Während Condensin I die SSB korrigiert, ist Condensin II für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB, *double strand brakes*) durch homologe Rekombination verantwortlich (Wu and Yu, 2012).

1.3.3. Tumorrelevanz von SMC2

Bereits 2007 konnte gezeigt werden, dass in Phytothorax assoziierten Lymphomen Mutationen in Condensin zu abnormalen chromosomalen Strukturen führen (Ham et al., 2007). Erst 5 Jahre später, 2012 zeigte Davalos et al., dass eine hohe SMC2-Expression im Dickdarmkarzinom mit einer nukleären Lokalisation von β -Catenin zusammenhängt und dass SMC2 ein Ziel des WNT-Signalweges ist (Davalos et al., 2012), der wiederum viele wichtige onkogene Funktionen in vielen Tumoren ausübt.

Die 19 Mitglieder der Familie der WNT-Proteine bestehen aus Cystein-reichen Glykoproteinen (Logan and Nusse, 2004) und spielen eine zentrale Rolle in der Embryogenese, Entwicklung und in der Homöostase von Gewebe. Einige WNT-Liganden werden mit der Karzinogenese und dem Tumorverlauf in Verbindung gebracht. Dabei sind hohe Expressionslevel von WNT1, WNT3A, und WNT7A fähig verschiedene Zelltypen in Tumorzellen zu transformieren. Andere WNT-Liganden wie WNT4 und WNT6, zeigen keine Fähigkeit zur Transformation von Zellen (Wong et al., 1994).

Die Rolle von *WNT5A* in der Tumorgenese kann nicht eindeutig definiert werden. Zum Beispiel konnte in hämatopoetischen Zellen und in Brust- und Nierentumoren gezeigt werden, dass *WNT5A* die Proliferation der Zellen inhibiert, während Daten in anderen Tumorarten zeigen, dass ein hohes Level von *WNT5A* den Tumorverlauf begünstigt (Liang et al., 2003, Olson and Gibo, 1998, Olson et al., 1998). Beispielsweise in Tumoren der Lunge, Magen oder Prostata begünstigt *WNT5A* die Motilität der Zellen und die Invasivität des Melanoms (Iozzo et al., 1995, Lejeune et al., 1995, Saitoh and Katoh, 2002, Weeraratna et al., 2002). In vorausgehenden Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Patrick Michl aus der Klinik für Gastroenterologie, Universität Marburg, konnte gezeigt werden, dass *WNT5A* im Pankreaskarzinom eine wichtige Rolle in der Apoptoseresistenz spielt (Griesmann et al., 2013).

1.4. Das Kandidatengen USP5 (ISO-T)

Die Ubiquitinierung von Proteinen spielt in vielen Signal- und Stoffwechselwegen der Zelle eine wichtige Rolle. Durch die Anheftung von mehreren Ubiquitinresten wird unter anderem die Proteindegradation im Proteasom, die DNA-Reparatur, ribosomale Funktionen und die Signaltransduktion reguliert (Wilkinson et al., 2005).

Die Ubiquitin-spezifische Peptidase 5 (USP5), auch ISOT (38 kDa) genannt, gehört zur größten der fünf Unterklassen der deubiquitinierenden Enzyme (DUBs), der Familie der Ubiquitin-spezifischen Peptidasen (USP). Es gibt etwa 56 Familienmitglieder im Menschen. Die katalytische Domäne der USP-Proteine, kann zwischen 250 und 850 Aminosäuren betragen und beinhaltet sechs konservierte Motive. Zwischen den Motiven können N- oder C- terminale Verlängerungen oder Insertionen auftreten. Zwei der Motive sind hoch konserviert und beinhalten die katalytische Region, die Cys-Box (Cys) und die His-Box (His und Asp/Asn). Die Enzymklasse erkennt und bindet das Substrat durch eine Interaktion mit dem Substrat direkt oder mit Substratadaptern in Multiproteinkomplexen (Eletr and Wilkinson, 2014, Wilkinson et al., 2005).

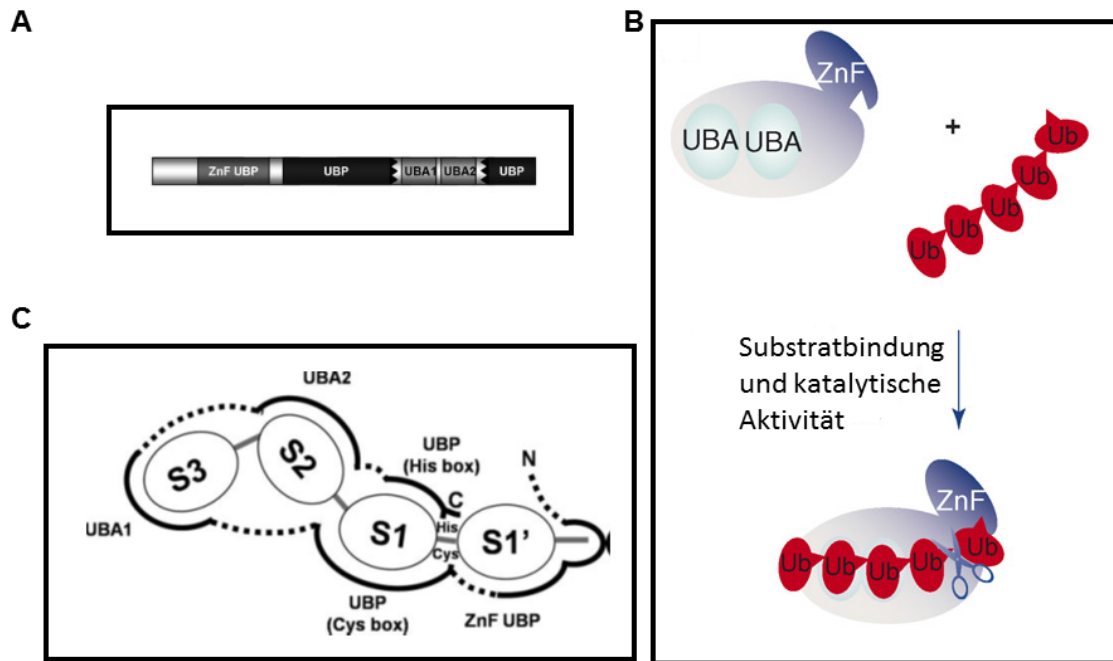


Abbildung 1-5 Darstellung der USP5-Struktur mit den verschiedenen Domänen und der Ubiquitinbindung.

(A) Dargestellt ist die Anordnung der unterschiedlichen Domänen UBA1 (nUBA) und UBA2 (cUBA), sowie die beiden UBP Domänen (cUBP, nUBP) und der katalytischen Zink-Finger Domäne (ZnF-UBP). (B) Modell der freien Ubiquitin-Kette (rot) und die UBA-Domänen des USP5 Proteins (blau). Darstellung der katalytischen Spaltung an der Zink-Finger Domäne (Schere). (C) Detailliertes Modell der Ubiquitin Bindungen im Protein. S1', S1, S2 und S3 stellt die verschiedenen Ubiquitine an den ubiquitin-bindenden Domänen (UBA1 und 2, beide UBP Domänen und die katalytische Zink-finger-Domäne dar. Durchgezogene Linien zeigen die strukturellen Motive, während die gestrichelten Linien keine Motive darstellen. N und C definieren den N- und C-Terminus von USP5. (Quelle: Bonnet et al., 2008, Reyes-Turcu et al., 2008)

Die Funktion von USP5 ist das Recyclen von monomerem Ubiquitin (Ub) durch die Spaltung von Polyubiquitin-Ketten. Dabei zeigten Studien, dass USP5 bevorzugt längere K48-Polyubiquitin-Ketten (≥ 4) spaltet. Die Kristallstruktur des Proteins zeigt insgesamt 4 Ub- Bindungsstellen. Das freie C-terminale Gly-Gly-Motiv der Polyubiquitin-Ketten interagiert mit der Zink-Finger-Domäne. Weitere Interaktionsstellen befinden sich in den beiden Ubiquitin-assoziierten-Domänen (N-Terminal nUBA und C-Terminal cUBA) und der C-terminalen ubiquitin-binde-Domäne (cUBP) Domäne. Für die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes ist die Anwesenheit der N-terminalen ubiquitin-bindende Domäne (nUBP) verantwortlich (Abbildung 1-5) (Reyes-Turcu et al., 2008, Bonnet et al., 2008, Avvakumov et al., 2012).

Eine aktuelle Studie von Nakajima konnte zeigen, dass USP5 bei der Reparatur von DSB beteiligt ist (Nakajima et al., 2014). Dabei eliminiert USP5 das Ub-Signal von DNA-Fragmenten und ist notwendig für eine effiziente DSB-Reparatur.

Bisher gibt es keine Daten, die eine Rolle von *USP5* in Tumoren beschreibt. Jedoch ist im Kolonkarzinom eine stabilisierende Funktion von *USP5* auf *TP53* beschrieben, indem der Abbau von *TP53* im Proteasom spezifisch verzögert wird. (Dayal et al., 2009).

Eine Mutation oder Deletion im Tumorsuppressor *TP53* ist in vielen Fällen eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines Tumors, mit der Folge, dass in der Zelle wichtige regulatorische Mechanismen, wie beispielsweise die Einleitung der Apoptose nach ungewöhnlich vielen DNA-Brüchen, nicht mehr funktionieren. *TP53* liegt in fast 50 % aller Pankreaskarzinome in einer mutierten oder deletierten Form vor (Casey et al., 1993).

1.5. Ziel der Arbeit

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist eine der tödlichsten und am schwersten behandelbaren Krebserkrankungen in der westlichen Welt. Durch die begrenzten diagnostischen Möglichkeiten und die wenigen wirksamen Medikamente ist die Behandlung nur in seltenen Fällen erfolgreich.

Durch den RNAi-Screen auf „*druggable genes*“ ergaben sich neue potentielle Kandidatengene, die in Zukunft für eine bessere medikamentöse Behandlung zur Verfügung stehen könnten. Das Screeningverfahren liefert jedoch keine Rückschlüsse auf zelluläre Funktionen der ermittelten Gene.

Das Ziel der Arbeit war es, die funktionellen Rollen von *SMC2* und *USP5* in Pankreaskarzinomzellen zu charakterisieren. Die klinische Relevanz sollte mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Experimenten aufgeklärt werden. Funktionelle und zellbasierte Assays dienten dazu die Effekte der Genprodukte auf Proliferation, Vitalität, substratunabhängiges Wachstum, Migrationsverhalten, Zellzyklus und Apoptose zu analysieren. In Einzelanalysen sollten im Pankreaskarzinom bisher unbekannte regulatorische Mechanismen und Signalwege aufgedeckt werden. Die Funktionalität der Gene sollte auch in einem subkutanen Xenograft-Mausmodell *in vivo* demonstriert werden.

2. Material

2.1. Geräte

Tabelle 2-1 Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
5100 Cryo 1°C Freezing Container „Mr. Frosty“	Nalgene Labware/Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
7500 Fast Real-Time PCR Systems	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Autoklav 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V. (Breda, Niederlande)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Brutschrank 6000	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Cell Observer® fluorescence microscope	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Certomat H + R	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Chemocam	Intas (Göttingen, Deutschland)
DNA Engine® Thermal Cycler	Biorad Laboratories (Hercules, USA)
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Electrophoresis Power Supply EPS3500	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Einkanalpipetten Physio care Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Feinwaage Mettler AE163	Mettler-Toledo GmbH (Greifensee, Schweiz)
Gefriertank HC35	Taylor-Wharton (Theodore, USA)
Gel Print P93DW	Mitsubishi Electric (Tokio, Japan)
Inkubationsschüttler	Köttermann (Uetze / Hänigsen, Deutschland)
Magnetrührer MR2002	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mikrotom	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikrowelle VIP 20	Bauknecht Hausgeräte GmbH (Stuttgart, Deutschland)
Mikroskop	Olympus (Shinjuku, Japan)
Multiscan FC	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr (Biberach, Deutschland)

Gerät	Hersteller
-80°C Gefrierschrank	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
Nanodrop 1000	PeqLab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Pipettboy Accu	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Sterilbank MSC advantage	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tiefkühlager Hera freeze	Thermo Electron Corporation (Massachusetts, USA)
Vortexer VF2	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Wasserbad	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Western Blot Aparatur	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Zentrifuge Cryofuge 5000	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Labofuge 400e	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Rotixa 120R	Hettich GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge Varifuge K	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)

2.2. Chemikalien

Tabelle 2-2 Auflistung der verwendeten Chemikalien und sonstige Reagenzien

Reagenz	Hersteller
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aceton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bacto-Agar	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Cycloheximide	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Desoxy-Nucleotidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)

Reagenz	Hersteller
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
DNase-freie RNase	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Doxycycline hyclate	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ECL Plus / ECL Ultra Western Blotting Detection Reagents	Perkin Elmer (Massachusetts, USA)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylenglycol-bis(aminoethylester)-N,N,N,N-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fötales Kälber Serum (FCS)	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
FxCycle™ Violet stain	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Glycerol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
HDgreen plus	Intas (Göttingen, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Kälberserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Luria Broth, Luria Agar	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Manganchloride (MnCl ₂)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
MG132	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Milchpulver	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natrium Orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumpyrophosphatdecahydrate (Na ₄ P ₂ O ₇ *10H ₂ O)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Reagenz	Hersteller
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Polyacrylamid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Polybrene	Santa cruz (Santa cruz, USA)
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Protease Arrest	G-Biosciences (St. Louis, USA)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Salzsäure (HCL)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<i>Silencer</i> ® Negative control #2 siRNA	Life Technologies (Carlsbad, USA)
siLentfect	Biorad Laboratories (Hercules, USA)
Succrose	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
SYBR®-green	Biorad Laboratories (Hercules, USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Thiazolylblau	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tween®-20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-3 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Combitips biopur 5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Combitips plus 2,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Cryoröhrchen 2 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Einwegnadeln & -spritzen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Einwegpipetten 10 ml; 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Einwegpipetten 2 ml; 5 ml; 50 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)

Material	Hersteller
Frischhaltefolie	Sarogold (Rohrschacherberg, Schweiz)
Gewebekulturflasche T-175 mm ²	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturflasche T-75 mm ² ; T-25 mm ²	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturplatten 24-Loch; 48-Loch; 96-Loch	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Gewebekulturplatten 6-Loch; 12-Loch	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturschalen 6 mm; 10 mm	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Glasware	Schott (Mainz, Deutschland)
Kosmetiktuch	Igefa (Ahrensfelde, Deutschland)
Latexhandschuhe	VWR (Radnor, USA)
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
Parafilm	Pechiney plastic company (Chicago, USA)
Petrischalen 10 mm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen Diamond D1000; D200; D10	Gilson (Middleton, USA)
Pipettenspitzen Eppendorf Style 1000 µl	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Polypropylengefäße 13 ml; 15 ml; 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Polysterengefäße 12 ml	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Polystyrene Round Tube 5 mL	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Reagiergefäße, Polypropylen 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
SFCA Filter Unit 500 ml (75 mm Ø)	Nalgene Labware/Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Skalpell	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterilfilter 0,45 µm	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
View Plate 96-Loch FTC (für BrdU-Assay)	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Whatman Gel Blotting Papier	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.4. Verwendete Kits

Tabelle 2-4 Auflistung der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
BrdU	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Midi Prep	Macherey und Nagel (Düren, Deutschland)
mRNA Isolationskit	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
mRNA Isolationskit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Omniscript	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.5. Antikörper für Westernblot

Tabelle 2-5 Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Größe (kDa)	2. Ak	Puffer
Aktin-HRP	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	1:40000	42	//	5 % Milch
anti-mouse HRP	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:10000	//	//	5 % Milch
anti-rabbit HRP	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:10000	//	//	5 % Milch
Caspase3	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:1000	17,19,35	Kaninchen	5 % Milch
cleaved Caspase3 (D175)	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:1000	17,19	Kaninchen	5 % Milch
Cyclin A	Santa cruz (Santa cruz, USA)	1:1000	54	Kaninchen	5 % Milch
Cyclin B1 (V152)	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:1000	58	Maus	5 % Milch
Cyclin D1	Abcam (Cambridge, USA)	1:500	33	Kaninchen	5 % Milch
p21 Waf1/Cip1 (12D1)	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:1000	21	Kaninchen	5 % Milch

Antikörper	Firma	Verdünnung	Größe (kDa)	2. Ak	Puffer
p27 (c19)	Santa cruz (Santa cruz, USA)	1:500	27	Kaninchen	5 % Milch
P53 (DO-1)	Santa cruz (Santa cruz, USA)	1:1000	53	Maus	5 % Milch
PARP	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:1000	24,89,116	Kaninchen	5 % Milch
p-histone H2A.x (S139) (20E3)	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:1000	15	Kaninchen	5 % BSA
β-Catenin	Cell Signaling (Danvers, USA)	1:1000	92	Kaninchen	5% Milch
Ubiquitin mAB P4D1	Enzo life science (Farmingdale, USA)	1:1000	Freies Ub: 8,6, 17, 26, 34, 43, 52, 60,	Maus	5 % Milch

2.6. Enzyme

Tabelle 2-6 Auflistung der verwendeten Enzyme

Enzym	Aktivität	Hersteller
EcoRI	20 000 U/ml	NEB (Massachusetts, USA)
Agel	5000 U/ml	NEB (Massachusetts, USA)
T4 Ligase	100000 U/ml	NEB (Massachusetts, USA)

2.7. Oligonukleotidsequenzen

2.7.1. Primer für qRT-PCR

Tabelle 2-7 Auflistung der verwendeten Primersequenzen von Biomers (Ulm, Deutschland)

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
hAHCYL1 rev	tcctcttcaggccatccaaa
hAHCYL1 for	ctctgtgttccggccatga
hGSPT1 for	ctgcaaatgcaaacgtgctt
hGSPT1 rev	gagcaacgtagagaacaaatgctt
hPFAS for	tctcagcggactcgataatct
hPFAS rev	tctgaaccacatgctgtttcct
hRAE1 for	ctggccttgctgctcagatt
hRAE1 rev	accacttgggccttagga
hSMC2 for	acacttctgcaaccacagctttag
hSMC2 rev	gttccccctttctagtagctttt
hTRIP13 for	tcacagcccacgatttgagt
hTrip13 rev	tttctgtctcttctccagattttc
hUSP5 for	ccctgcaggccaagtcagt
hUSP5 rev	cagtctaagccgaagggaacttc
hP27/CDKN1B for	gacttggagaagcactgcagaga
hP27/CDKN1B rev	gccactcgtacttgccctcta
RPLP0 for	tgggcaagaacacccatgatg
RPLP0 rev	agtttctccagagctgggtgt
hWNT5A for	gtggccctgctgtgatcat
hWNT5A rev	ttcaaccaacacgcatttc

2.7.2. siRNA Sequenzen

Tabelle 2-8 Auflistung der siRNA Sequenzen von Biomern (Ulm, Deutschland)

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Hersteller
SMC2 siRNA#1 (s1)	GGUGGUUAUUGGUGGUAGA	Life Technologies
SMC2 siRNA#2 (s2)	GGGCCGAAUUACAAAAGUA	Life Technologies
USP5 siRNA#1 (u1)	GGAGAAGUUUGAAUUAGAC	Life Technologies
USP5 siRNA#2 (u2)	GGAUGUGAAGAUUGUCAUU	Life Technologies
USP5 siRNA#3 (u3)	GGAUGUGAGGGAAAUAGG	Life Technologies
WNT5A siRNA#1 (w1)	GCAAUGUCUCCAAGUUCUCCUAG	Life Technologies
WNT5A siRNA#2 (w2)	GGACUUUCUCAAGGACAGA	Life Technologies
P27/CDKN1B siRNA#1 (p1)	GGAAUAAGGAAGCGACCUG	Life Technologies
P27/CDKN1B siRNA#1 (p1)	GGAAGGUUCAUGUAGAGAA	Life Technologies

2.7.3. Klonierungsoligonukleotide

Tabelle 2-9 Auflistung der Sequenzen für die Klonierung von Biomern (Ulm, Deutschland)

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
pLKO - SMC2 siRNA#1 (p-s1) sense / antisense	ccggcaggtggttattggtgtagactcgagtctaccaccaataaccacctgttttg
	aattcaaaaacaggtggttattggtgtagactcgagtctaccaccaataaccacctg
pLKO - SMC2 siRNA#2 (p-s2) sense / antisense	ccggcagggccgaattacaaaagtactcgagtacttttgtaattcggccctgttttg
	aattcaaaaacagggccgaattacaaaagtactcgagtacttttgtaattcggccctg
pLKO – USP5 siRNA#1 (p-u1) sense / antisense	ccgggaggagaagttgaattagacctcgaggtctaattcaaacttctcctcttttg
	aattcaaaaagaggagaagttgaattagacctcgaggtctaattcaaacttctcctc
pLKO - USP5 siRNA#2 (p-u2) sense / antisense	ccgggaggatgtgaagattgtcattctcgagaatgacaatcttcacatcctcttttg
	aattcaaaaagaggatgtgaagattgtcattctcgagaatgacaatcttcacatcctc
pLKO - USP5 siRNA#3 (p-u3) sense / antisense	ccgggagggatgtgagggaaatgagctcgagcctatttcctcacatccctcttttg
	aattcaaaaagagggatgtgagggaaatgagtcgagcctatttcctcacatccctc

2.8. Zelllinien

Tabelle 2-10 Ursprung der Zelllinien

Name	Ursprung	Quelle
PaTu8988T	Aus der Lebermetastase eines primäre duktalen Pankreas Adenokarzinoms (PDAC) von einer 64 jährigen Frau	(Elsasser et al., 1992)
Suit2-007	Subklon der pankreatischen Krebszelllinie Suit2, die aus einer Lebermetastase isoliert wurde, mit einem hohen metastatischen Phänotyp	(Iwamura et al., 1987)
Panc-1	Etabliert aus einem primären PDAC von einem 56 jährigen Mann	(Lieber et al., 1975)
IMIMPC-2	Aus einem primären duktalen Adenokarzinom	(Vila et al., 1995)
BxPC2	Humanes Adenokarzinom aus dem Pankreaskörper	(Tan et al., 1986)
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	(Graham et al., 1977)
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen mit dem SV40 „large T“ Antigen für die Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung	(DuBridge et al., 1987)

2.9. Plasmid

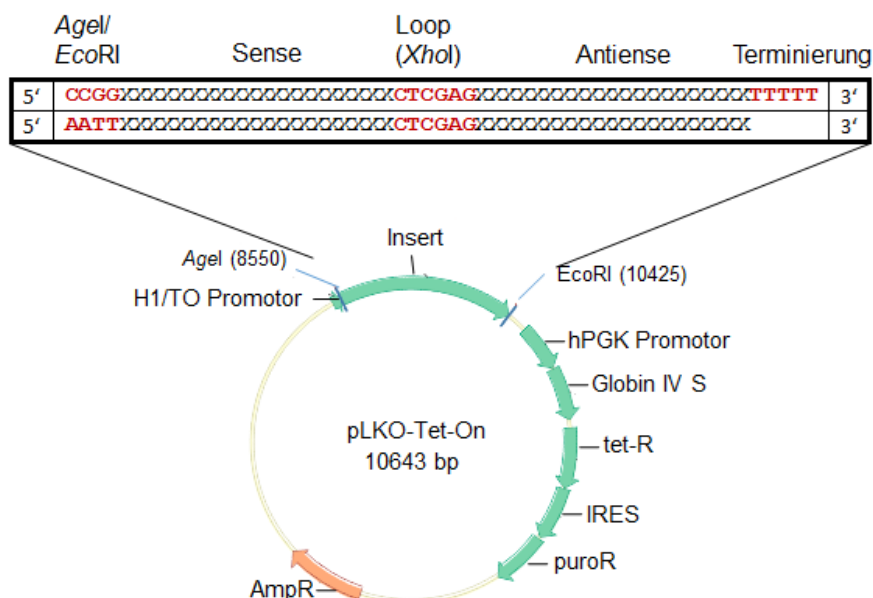


Abbildung 2-1 Darstellung des verwendeten pLKO-Tet-On Vektors

Die Ampicillinresistenz ermöglicht eine Selektion auf positive Klone in den Bakterien. Die Puromycinresistenz ermöglicht die Selektion in eukaryotischen Zellen. Das Insert, eine short hairpin RNA (shRNA), befindet sich vor dem H1-Promotor. Zusätzlich sind alle notwendigen Komponenten für die induzierbare Expression des Inserts.

2.10. Lösungen

2.10.1. DNA/RNA-Ladepuffer

Tabelle 2-11 Zusammensetzung des Ladepuffer

10x Ladepuffer	
Glycerol	30%
EDTA	0,1 mM
Bromphenolblau	0,2%

2.10.2. Enzympuffer

Tabelle 2-12 Zusammensetzung der Puffer für Enzyme

NEB-Puffer 2		NEB-cut smart Puffer		T4-DNA Ligase-Puffer	
NaCl	50 mM	Ka-Acetat	50 mM	Tris-HCL	50 mM
Tris-HCL	10 mM	Tris-Acetat	20 mM	MgCL ₂	40 mM
MgCL ₂	10 mM	Mg-Acetat	10 mM	ATP	1 mM
DTT	1 mM	BSA	100 µg/ml	DTT	1 mM
pH 7,9		pH 7,9		pH 7,5	

2.10.3. Kompetente Bakterien

Tabelle 2-13 Zusammensetzung der RF Puffer für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

RF I		RF II	
RbCl	100 mM	RbCl	10 mM
MnCl ₂ x 2 H ₂ O	50 mM	MOPS	10 mM
Kaliumacetat	30 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O	75 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	100 mM	Glycerol	15 %
Glycerol	15 %		
pH mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8		pH mit NaOH auf 5,8	

2.10.4. MTT-Solubilisierungslösung

Tabelle 2-14 Zusammensetzung der Solubilisierungslösung

Solubilisierungslösung	
HCL (0,1 M)	1 ml
Triton X-100 10 %	1 ml
Isopropanol	8 ml

2.10.5. Zellkultur

2.10.5.1. Zellkulturmedium

DMEM Komplett	
DMEM + L-Glutamin	1 ml
10 % FCS	1 ml

2.10.6. Westernblot

2.10.6.1. Lysepuffer

Tabelle 2-15 Zusammensetzung des Lysepuffers und der Phosphataseinhibitoren

Lysepuffer		Phosphataseinhibitoren	Stock-Lösung	Endkonzentration
HEPES pH 7,5	50 mM	EGTA	0,5 mM	1 µl/ml
NaCl	150 mM	Na ₃ VO ₃	100 mM	20 µl/ml
EGTA	1 mM	Na ₄ P ₂ O ₇	100 mM	10 µl/ml
100 % Glycerol	10 %	PMSF	100 mM	25 µl/ml
Triton X-100	1 %	NaF	1 M	50 µl/ml
NaF	100 mM	Protease Arrest	100x	10 µl/ml
Na ₄ P ₂ O ₇	10 mM	In PBS		

2.10.6.2. Gele

Tabelle 2-16 Zusammensetzung Trenngel

Trenngele	10% Gel	12,5% Gel	15% Gel
Trenngelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Wasser	2,2 ml	1,8 ml	1,2 ml
Acrylamidlösung	2,0 ml	2,4 ml	3,0 ml
Glycerol	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
10 % APS	10 µl	10 µl	10 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 2-17 Zusammensetzung Sammelgel

Sammelgel	
Sammelgelpuffer	0,5 ml
Wasser	1,18 ml
Acrylamidlösung	0,32 ml
10 % APS	5 µl
TEMED	5 µl

2.10.6.3. Laufpuffer, Transferpuffer, Ladepuffer, TBS

Tabelle 2-18 Zusammensetzung der 10x Westernblotpuffer und Ladepuffer

10x Transfer-Puffer	10x Laufpuffer	10x TBS	4x SDS Ladepuffer
250 mM Tris Base	250 mM Tris Base	500 mM Tris Base	200 mM Tris-HCL (pH6,8)
1,92 M Glycin	1,92 M Glycin	150 mM NaCl	0,4 % Bromphenolblau
	1 % SDS	pH 7,6 mit HCL	40/ % Glycerol
			8 % SDS

Tabelle 2-19 Zusammensetzung der 1x Westernblotpuffer

1x Transfer-Puffer	1x Laufpuffer	1x TBST
100 ml 10x Transfer-Puffer	100 ml 10x Laufpuffer	100 ml TBS
200 ml Methanol	900 Aqua dest	900 ml Aqua dest
700 Aqua dest		1 ml Tween-20

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Arbeiten

3.1.1. Arbeiten mit *E. coli*

3.1.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde die RbCl-Methode verwendet. Dafür wurde eine 5 ml Übernachtskultur von Bakterien 1:50 mit LB-Medium verdünnt und mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ für 2 Stunden bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 20 Minuten im Falcon bei 4 °C inkubiert und bei 3000 rpm 8 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 16,5 ml kalter RF I-Lösung resuspendiert und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach erneutem Pelletieren wurden 2,5 ml RF II-Lösung hinzugegeben, resuspendiert und weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bakterien in 50 - 100 µl Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Top10 Genotype: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* λ-

3.1.1.2. Transformation von Bakterien

Alle Transformationen wurden mit chemisch kompetenten TOP10 Bakterien durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und 10 Minuten auf Eis mit der zu transformierenden DNA inkubiert. Nach dem Hitzeschock von 40 Sekunden bei 42 °C wurden die Bakterien 2 Minuten mit 200 µl LB-Medium ohne Antibiotikum auf Eis inkubiert. Nach 45 Minuten Schütteln bei 37 °C, wurden die Bakterien auf Agarplatten mit der richtigen Antibiotikaresistenz ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.1.3. Plasmid Mini-/ Midi Präparation

Für die Midi Präparation wurden 100 ml Bakterienkultur über Nacht bei 37 °C geschüttelt und anschließend nach dem Protokoll des NucleoBond® 100 Kits von Macherey und Nagel die Plasmid DNA isoliert. Dabei wurde mittels der alkalischen Lyse durch die Puffer S1, S2 und S3 die DNA isoliert und durch eine, auf Silikat-basierten Anionen-Austausch Säule, aufgereinigt und eluiert. Eine anschließende DNA-Fällung ermöglicht eine Konzentrierung der Plasmid-DNA. Dafür wurde das Eluat mit 100 %-igen Isopropanol gemischt, abzentrifugiert und anschließend das Pellet mit 70 %-igen Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in etwa 150 µl Wasser gelöst.

Für Mini-Präparationen wurde eine 5 ml Übernachtskultur verwendet. Nach der Sedimentation und anschließender alkalischer Lyse, wurde die Lösung neutralisiert und 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde mit 100 %-igem Isopropanol gemischt und 20 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm gefällt. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 30 µl Wasser gelöst.

3.1.1.4. Konzentrationsbestimmung von Plasmid DNA

Die Konzentration der isolierten DNA wurde am NanoDrop 1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Dabei wurde 1 µl der unverdünnten DNA-Lösung auf die Messvorrichtung aufgetragen. Die Qualität wurde anhand der Wellenlängenverhältnisse 230/260 nm und 280/260 nm bestimmt.

3.1.2. Arbeiten mit Plasmid-DNA

3.1.2.1. Restriktion von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der Plasmide oder für die Klonierung wurden DNA-Plasmide mit Restriktionsenzymen geschnitten. Dazu wurde mindestens 1 Unit Enzym pro µg DNA mit dem passenden Puffer, und wenn notwendig, BSA gemischt und bei 37°C für mindestens 45 Minuten verdaut.

3.1.2.2. Auftrennung von DNA oder RNA in Agarosegelen

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein Agarosegel verwendet. Je nach aufzutrennendem DNA- oder RNA-Fragment wurde 0,8 bis 2 % Agarose in TBE gelöst. In 100 ml der auf ca. 60 °C abgekühlten Agarose wird 1 µl HDGreen zugegeben und in den Gelschlitten zum Aushärten gegossen. HDGreen ist ein Ersatzstoff für Ethidiumbromid und interkaliert in DNA und RNA. Nach dem Aushärten wurde die DNA oder RNA mit 10x Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Zusätzlich muss ein Marker auf das Gel aufgetragen werden, um die Fragmentgröße bestimmen zu können. Die Nukleinsäuren wurden bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Nach dem Auftrennen konnten die unterschiedlichen Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch das Anregen des HDGreens mit UV-Licht, leuchteten die DNA- bzw. RNA-Fragmente im Agarosegel grün und werden somit sichtbar. Das sichtbare Bandenmuster wurde digital gespeichert und ausgedruckt.

3.1.2.3. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um die DNA nach einem Restriktionsverdau weiter verwenden zu können, muss diese aus dem Agarosegel zurückgewonnen werden. Nach der Auftrennung im Agarosegel wurde die zu klonierende Bande auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell herausgeschnitten und nach dem Protokoll des Qiagen QIAEX II-Kit aufgereinigt. Das Gelstück wurde in QX1 Puffer gelöst und auf eine Trennsäule gegeben. Diese bindet die gelöste DNA aufgrund der gegebenen Pufferbedingungen. Anschließend wurde die DNA gewaschen und in 30 µl Wasser eluiert.

3.1.2.4. Fällern von DNA

Um DNA einem weiteren Reinigungsschritt zu unterziehen wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 ihres Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem 100 %-igen Ethanol versetzt und für mindestens 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Danach wurde die gefällte DNA für 20 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm mit einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit eiskaltem, 70 %-igen Ethanol gewaschen um noch vorhandene Salze zu entfernen. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Pellet in geeigneter Menge Wasser resuspendiert.

3.1.2.5. Annealen von shRNA – Oligonukleotide

Zuerst wurden beide lyophilisierten shRNA-Oligonukleotidsequenzen mit einer Konzentration von 1 µg/ml in Wasser resuspendiert. Um die Oligonukleotide zu *annealen*, wurden 5 ng Sense- und 5 ng Antisense-Oligonukleotides mit 5 µl 10x NEB-Puffer 2 in einem Gesamtvolumen von 50 µl 4 Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide in einem 1 Liter-Becherglas 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und langsam über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.1.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von zwei DNA-Fragmenten in einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 gemischt und 10x Ligationspuffer sowie 1 µl T4 Ligase zugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei etwa 16 °C, wurden 2 µl des Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert (4.1.1.2)

3.1.3. Arbeiten mit Zellen und Geweben

3.1.3.1. Isolation von mRNA

3.1.3.1.1. Aus Zelllinien

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde das Peqlab-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Das gesamte Zelllysate wurde zuerst auf eine DNA-*Removing* Säule geladen, um DNA-Verunreinigungen zu verhindern. Die im Durchfluss befindliche RNA wurde anschließend in 70 %-igen Ethanol gefällt und auf eine Säule mit selektiv bindender Silikatmatrix gegeben. Durch mehrere Waschschrte wurde die RNA gereinigt und anschließend mit DNase/RNase freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop 1000 gemessen (4.1.1.4.).

3.1.3.1.2. Aus Geweben

Um RNA aus Gewebe zu isolieren, wurde ein kleines gefrorenes Gewebestück mit der Größe eines Stecknadelkopfes im gekühlten Keramikmörser zu Pulver zerstoßen. Das Pulver wurde in Lysepuffer aufgenommen und auf eine Qiagen-Shredder Säule gegeben. Die im Durchfluss befindliche RNA wurde auf eine RNA-bindende-Säule geladen, gewaschen und nach dem Protokoll des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) mit Wasser isoliert.

3.1.3.2. cDNA Synthese

Da DNA-Polymerasen, die in PCR-Ansätzen verwendet wird, keine RNA als Template erkennen, muss mRNA zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Für die cDNA Synthese mit dem Omniscript-RT-Kit wurden zwischen 100 ng und 1 µg mRNA verwendet. Die RNA wurde mit Wasser, für ein Gesamtvolumen von 20 µl, und 0,5 µl 100 µM Oligo-dT-Primer für 3 Minuten auf 70 °C erhitzt und danach schnell auf Eis abgekühlt. Nach dem Erkalten wurde ein Mastermix mit 2 µl Puffer, 2 µl 5 nM dNTPs und 0,5 µl RT-Enzym zugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.1.3.3. qRT-PCR

Die Methode der quantitative *Real-Time-PCR* (qRT-PCR) basiert auf einer spezifischen Amplifikation eines kurzen Genabschnittes nach dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und erlaubt zusätzlich die Quantifizierung des Ausgangsproduktes. Der Zeitraum bis zum Auftreten eines Amplifikationsproduktes ist ein Maß für die mRNA-Menge im Ausgangsmaterial. Dadurch kann eine Aussage über die Zu- oder Abnahme der Expression eines bestimmten Gens getroffen werden. Während der *Real-Time-PCR* wird nach jedem Zyklus ein Fluoreszenzsignal gemessen, dass proportional zur dsDNA-Menge ist. In dieser Arbeit wurde SYBR-Green verwendet, welches in die dsDNA interkaliert.

Bestimmung der Expressionlevel von Genen

Die Höhe des Expressionslevels eines Gens wurde in unterschiedlichen primären Geweben und in verschiedenen Zelllinien analysiert. Außerdem wurde die qRT-PCR-Methode zum Nachweis des *Knockdown* angewendet.

Die untersuchten cDNAs wurden anhand eines mitgeführten Referenzgens quantifiziert. Für die Auswertung wurde das mRNA-Signal der Proben auf die Menge der gesamten mRNA mittels des *RPLP0* normalisiert.

Die Reaktion wurde lichtgeschützt angesetzt und bestand pro Loch aus 20 µl gesamt Volumen. Auf 1 µl cDNA (~ 5 ng) wurde 19 µl Mastermix, bestehend aus 10 µl SYBR Green Mastermix von BioRad, 0,2 µl je Primer (je 10 µM) und 8,6 µl Wasser, zugegeben. Das *Real-Time-PCR* – Programm ist in Tabelle 3-1 zu sehen.

Tabelle 3-1: Realtime Cycler Programm zur Bestimmung des mRNA Levels

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	40x
Annealing/ Elongation	60 °C	60 Sekunden	
Schmelzkurve	95 °C	Detektion alle 0,2 °C	

3.1.3.4. Westernblot

3.1.3.4.1. Protein Isolation

Um Proteine mittels SDS-PAGE untersuchen zu können, war es notwendig, Zelllysate herzustellen. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach dem Abschaben von der Zellkulturschale bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen entweder in 50 µl Lysepuffer resuspendiert und 45 Minuten auf Eis inkubiert, oder in PBS mit Protease-Arrest und Phosphataseinhibitoren resuspendiert und anschließend sonifiziert (6x bei einer Intensität von 35 % und einem Zyklus von 0,58 Sekunden). Die Zelllysate wurden bis zum Gebrauch bei –20 °C aufbewahrt.

3.1.3.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Um beim Einsatz einer immunologischen Detektion von Proteinen den Gesamtgehalt an Proteinen in den Zelllysaten abschätzen zu können, führt man eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durch (Bradford, 1976). Hier macht man sich die Tatsache zunutze, dass Coomassie-Blau bei der Bindung an Proteine vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird. Dadurch wird das Absorptionsmaximum der Proteine von 465 nach 595 nm verschoben. Die Größe der Absorption ist innerhalb eines gewissen Konzentrationsfensters zur Proteinkonzentration proportional.

Um die Konzentration der unbekannten Proben bestimmen zu können, wurde in einer 96-Loch-Platte, zusätzlich zu den zu messenden Proben, eine BSA-Standardreihe angesetzt.

Hierzu wurden BSA-Lösungen mit einer aufsteigenden Konzentration von 0 bis 8 µg/ml hergestellt und mit 150 µl Coomassie Plus Protein Reagent vermischt. Von den Zelllysaten wurde 1,5 µl entnommen und ebenso mit 150 µl Coomassie Plus Protein Reagent vermischt. Nach einer Inkubationsdauer von 5 Minuten, in der sich die

Komplexe bilden, wurde die Absorption der einzelnen *wells* im ELISA-Reader gemessen. Mit den erhobenen Daten konnte mit dem BSA-Standard eine Eichkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration ermittelt wurde.

3.1.3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Auftrennung eines Proteingemischs eingesetzt. Dabei werden die Proteine durch Binden an das anionische Detergenz SDS denaturiert und die Ladungsdifferenzen der Proteine ausgeglichen. Durch die starke negative Ladung des SDS werden die Proteine allgemein negativ geladen und wandern zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit im Wesentlichen vom Molekulargewicht der Proteine abhängt: je größer die Proteine, desto langsamer die Wanderungsgeschwindigkeit.

Das SDS-Gel wurde nach dem Laemmli-System aufgebaut (Laemmli, 1970). Bei diesem System werden Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert, wovon sie in das Trenngel hineinwandern.

Zur Präparation des SDS-PAGE-Geles wurde zuerst das Trenngel gegossen (10 – 15 % Acrylamid mit Glycerol). Noch vor dem Polymerisieren wurde das Sammelgel (5 % Acrylamid) gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation kann das Gel bis zum Gebrauch feucht bei 4 °C aufbewahrt werden. Die SDS-PAGE Apparatur wurde gemäß Anleitung montiert, die Kammer mit 1-fach SDS-Laufpuffer gefüllt und die Geltaschen ausgespült, um Polyacrylamidreste zu entfernen. Die Proben wurden mit 4-fach SDS Ladepuffer versetzt, für 3 Minuten bei 95°C vollständig denaturiert und die Taschen mit 15 µg beladen, wobei ein geeigneter Größen-Marker mitgeführt wurde. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 120 V durchgeführt, bis die Proben vollständig in das Sammelgel eingewandert sind (ca. 30 Minuten). Anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht und die Elektrophorese für 90 bis 120 Minuten fortgesetzt. Die Zeit hängt von der Größe der nachzuweisenden Proteine ab.

3.1.3.4.4. Westernblot-Transfer

Der Westernblot dient dem Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran, wo sie immobilisiert werden.

Dafür wurden auf einen Schwamm zwei Lagen Whatman-Papier, die Membran und das Gel geschichtet. Auf das Gel wurden wiederum zwei Lagen Whatman-Papier und ein Schwamm aufgebracht. Diese Anordnung wurde gemäß der Gerätespezifikation in die Westernblot-Transfer-Apparatur eingesetzt. Während die Apparatur eisgekühlt wurde, war der Transfer bei einer Stromstärke von 300 mA für 45 Minuten bis 90 Minuten

durchzuführen. Die Transferdauer ist von der Größe der zu untersuchenden Proteine abhängig.

3.1.3.4.5. Immunologische Detektion

Die Proteine lassen sich immunologisch detektieren, da an die sekundär gebundenen Antikörper eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Diese Peroxidase oxidiert dabei das Luminol im ECL-Reagenz. Das dabei emittierte Chemilumineszenzlicht kann mittels einer photosensitiven Kamera detektiert werden.

Dafür wurde nach dem Transfer die Membran in Blockierlösung (TBST mit 5 % Magermilchpulver) 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die verwendeten Antikörper abzusättigen.

Zur Detektion wurde die Membran mit einem primären Antikörper gegen das gewünschte Protein bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBST (3x 10 Minuten) wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nochmals 3x 10 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgt über das Enhanced-Chemilumineszenz (ECL)-Reagenz. Das Reagenz besteht aus je einem Teil stabiler Peroxid-Lösung und Luminol/Enhancer-Lösung. Unmittelbar vor Gebrauch wurden beide Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und auf der Membran verteilt. Innerhalb eines kurzen Zeitraums konnte das emittierte Chemilumineszenzlicht mit Hilfe einer photosensitiven Kamera detektiert werden.

3.2. Methoden der Zellkultur

3.2.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Verwendete Medien, PBS und Trypsin wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur angewärmt. Alle Zellzahlbestimmungen wurden mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt.

3.2.2. Kultivieren von Zelllinien

PaTu-8988T, Panc-1, Suit2-007, IMIMPC-2 und HEK293-Zellen wuchsen als adhärenente Zelllinien in DMEM mit L-Glutamin und 10 % FCS. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie wurden die Zellen alle 3-4 Tage 1:5 bis 1:15 geteilt. Dazu wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin-EDTA bedeckt und für einige Minuten, bis zum Ablösen der Zellen, im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zum Inhibieren des Trypsins wurden die abgelösten Zellen in FCS-haltigem Medium resuspendiert und nach der Zellzahlbestimmung in einer geeigneten Dichte, wieder in frischem Medium, entweder in Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten ausgesät.

3.2.2.1. Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer-*Improved*-Zählkammer verwendet. Dafür wurden 3 große Quadrate ausgezählt. Der Durchschnitt der gezählten Zellen ergab die Zellzahl pro 0,1 µl. Durch das multiplizieren mit 10^4 ergibt sich die Zellzahl pro ml.

3.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Alle Zellen wurden in DMEM Medium mit 10 % FCS und 10 % DMSO im Einfrierbehälter mittels Isopropanol mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 °C/min langsam über Nacht bei -80 °C eingefroren. Danach konnten die eingefrorenen Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen der Zellen fand im 37 °C warmen Wasserbad statt. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und zum Waschen bei 300 g abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.3. Transfektionen von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden für den Knockdown mit siLentFect transfiziert. Dabei bildet das kationische Lipid einen Komplex mit den siRNAs. Dieser Komplex wird von der Zelle in Anwesenheit von Serum aufgenommen und führt zur transienten RNA-Interferenz.

Dafür wurde 20 µM siRNA in 150 µl Serum freiem DMEM-Medium mit 3 µl siLentFect in 150 µl Serum freiem DMEM-Medium gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit werden 1×10^5 Zellen in der 6-Loch Platte

vorgelegt und der Transfektionsansatz dazugegeben. Nach 6 Stunden, bzw. am nächsten Morgen, nach etwa 16 Stunden, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.2.4. Behandlung der Stablen shRNA-Populationen mit Doxycyclin

Die Funktionalität der Population mit stabil integrierter und mit Doxycyclin-induzierbarer shRNA wurde im MTT-Assay überprüft. Dafür wurden die Zellen 5 Tage mit und ohne 2 mg/ml Doxycyclin kultiviert und anschließend die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt (s. 4.2.6)

3.2.5. Die Behandlung der Zellen mit MG132 und Cycloheximid

Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 und dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid wurde mit PaTu-8988T-Zellen durchgeführt, um Proteine in der Zelle anzureichern, bzw. den Abbau der Proteine nachzuverfolgen. Dafür wurde 72 Stunden nach dem Aussäen der Zellen 30 μ M MG132 zum Medium zugegeben und für 6 Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium mit 20 μ M Cycloheximid ersetzt. Für die Behandlung der USP5 reprimierten Zellen wurde 48 Stunden nach der Transfektion das Medium durch 20 μ M Cycloheximid enthaltendes Medium oder dieselbe Menge an DMSO ersetzt. Nach der Zugabe des Cycloheximids wurden die Zellen stündlich für die Proteinisolation geerntet (s. 4.1.3.4.1).

3.2.6. Vitalitäts-Assay (MTT)

Der MTT-Vitalitäts-Assay ist eine Methode um die Teilungsrate von Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen zu bestimmen. Dazu wurde in PBS gelöstes MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) zu den Zellen geben. Dabei wird das wasserlösliche gelbe MTT in den Zellen durch NADPH zu dem unlöslichen blau-violetten Formazan reduziert. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 bis 2 Stunden wurden die Zellen mit der Solubilisierungslösung lysiert, wodurch das Formazan wieder gelöst wird und die optische Dichte bei 570 nm im Photometer gemessen werden konnte. Um im linearen Bereich des Photometers zu bleiben, kann die Lösung vor der Messung mit PBS verdünnt werden.

3.2.7. Proliferations-Assay (BrdU)

Zum Nachweis und Quantifizieren von Einflüssen auf die Zellproliferation, wurde mittels 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ein ELISA-basierter Zellproliferationsassay durchgeführt.

Während der DNA-Synthese in proliferierenden Zellen kommt es zum Einbau des Thymidin-Analogons BrdU. Das Zufügen eines mit Peroxidase (POD) gekoppelten Antikörpers gegen BrdU ermöglicht eine spezifische Substratreaktion, deren Produkt spektrophotometrisch gemessen werden kann. Das Produkt verhält sich proportional zur Menge neu synthetisierter DNA und damit zur Proliferation der Zelle. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. In einer *ViewPlate-96 Black* wurden 2000 Zellen pro *well* ausgesät. Pro Probe wurden 4 *wells* benötigt, die entsprechend gleich behandelt wurden. 3 Wells dienten als Messpunkt und 1 als Hintergrundprobe. Nach 48 Stunden erfolgte die Inkubation mit BrdU-haltigem Wachstumsmedium für 4-6 Stunden (37 °C, 5 % CO₂). Dabei wurden die Hintergrundproben nur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die 45-minütige Fixierung der Zellen und eine 1,5 stündige Behandlung mit einem Peroxidase-konjugierten anti-BrdU Antikörper. Die Messung der Chemolumineszenz (rlu/s) erfolgte mit Hilfe des Luminometers.

3.2.8. Analyse des Wachstums ohne Anheftung (Soft-Agar-Assay)

Eine Methode um das Wachstum ohne Adhärenz zu untersuchen ist der Soft-Agar-Assay. Dafür wurde 1 ml 5 % Bacto-Agar mit 9 ml DMEM – Medium mit FCS und Antibiotikum gemischt und auf 42 °C vorgewärmt, damit der Agar nicht vorzeitig fest wurde. Nachdem 1 ml dieser 0,5 % Lösung in einer 12 Loch-platte ausgehärtet war, wurde etwa 1 ml mit 15.000 transfizierten Zellen mit 2 ml Agar-Medium-Gemisch versetzt und 1 ml auf die ausgehärtete Masse gegeben. Um die Nährstoffversorgung zu gewährleisten und ein Austrocknen zu vermeiden, wurde nach dem Aushärten des zellhaltigen Agars mit 750 µl Vollmedium überschichtet. Nach 5 bis 9 Tagen hatten die Kolonien eine zählbare Größe erreicht. Bevor die Koloniedichte zu hoch wurde, wurden in jedem Loch 5 Gesichtsfedern ausgezählt. Dafür wurden die entstandenen Kolonien in jeder Ebene bei 10-facher Vergrößerung gezählt.

3.2.9. *Time-Lapse*

Neben den funktionellen Analysen wurde auch der Einfluss auf die Migrationsbewegungen der Zellen untersucht. Im Zuge dessen wurde die ungerichtete Zellbewegung mithilfe von *Time-Lapse*-Analysen untersucht, indem 36 Stunden nach der Transfektion 35.000 Zellen in eine mit Kollagen beschichtete 6-Loch-Platte umgesetzt wurden. Diese Zellen wurden über Nacht mit dem Zeiss Cell Observer®-Fluoreszenzmikroskop beobachtet und gefilmt. Dieses Mikroskop, ist von einem Zellinkubator umgeben, der annähernd normale Brutschrankgegebenheiten (37 °C, 5 % CO₂) simulieren kann. Die Zellen wurden bei ihren Bewegungen für 16 – 20 Stunden beobachtet. Mithilfe der Mikroskop-Software wurde dabei von jeder Probe in Intervallen von 10 Minuten ein Bild aufgenommen. Diese Bilder (bis zu n = 121) wurden am Ende zu einem Videofilm vereinigt, der mithilfe der Open Source-Software „*Time-Lapse-Analyzer*“ (Huth et al., 2011) ausgewertet wurde.

3.2.10. Durchflussszytometrie (Zellzyklusanalysen)

Für die durchflussszytometrischen Versuche wurden die Zellen 48 Stunden nach Transfektion trypsiniert und die in PBS überführte Suspension bei 1500 rpm (3 Minuten, RT) pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µL kaltem PBS gewaschen, in FACS-Röhrchen überführt und erneut pelletiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µL kaltem PBS gut resuspendiert und unter ständigem vortexen 1 ml eiskalte 70 %-ige Ethanollösung auf die Zellen getropft. Zum Fixieren wurden die Ansätze 24 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Für die Zellzyklusanalyse wurden die fixierten Zellen bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µL eiskaltem PBS 3x gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µL PBS mit FxCycle™-Violet (Endkonzentration: 1ng/µl) für 30- 45 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend am BD™ LRS-II Durchflussszytometer mit dem Violetten Laser bei einer Wellenlänge von 405 nm und einem Bandpass Filter von 440/40 nm analysiert. Der Datensatz wurde mit der Software *Flowjo* ausgewertet.

3.2.11. Virusproduktion in HEK293T

Die stabile Transduktion von pLKO-shRNA Vektoren wurde mit Lentiviren der zweiten Generation durchgeführt. Dafür wurde ein Transfektionsansatz hergestellt. Für den

Ansatz wurden mit 7,5 µg Plasmid pLKO Vektor, 4,9 µg pSPAX2 und 2,6 µg pMD2.G mit 50 µl 2,5 M CaCl₂ gemischt und mit sterilem Wasser auf 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 500 µl 2x HBS tropfenweise dazugegeben und kurz gevortext. Dieses DNA-Gemisch wurde ins Medium von HEK293T Zellen gegeben und 24 Stunden inkubiert. Durch die Zugabe der beiden zusätzlichen Plasmide werden die notwendigen Proteine *gag*, *pol*, *tat*, *rev* und *vsv-g* für die Virusherstellung bereitgestellt. Für die Virusernte wurde der Überstand der HEK293T-Zellen durch einen 0,45 µM Filter filtriert. Anschließend kann das Virus direkt auf die Zielzellen gegeben werden oder bei –80 °C gelagert werden.

3.2.12. Transduktion und Selektion von Zellen

Das Lentivirus wurde mit 8 µg/ml Polybrene auf PaTu-8988T-Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um nicht integrierte Viren von den Zellen zu entfernen und um eine toxische Wirkung des Virus zu verhindern. Anschließend wurde Selektionsmedium zu den Zellen gegeben. Die Selektion erfolgte mit 0,5 µg/ml Puromycin für 5 Tage. Während der Selektion wurde alle 2 Tage das Medium ausgetauscht. Nach der Selektion wurde entweder eine Mischpopulation kultiviert oder einzelne Klone von den Schalen gepickt.

3.3. RNAi-Screen

Sowohl die Durchführung, als auch die Auswertung des shRNA-Screens wurde im DKFZ Heidelberg von der Arbeitsgruppe Hoheisel, Abt. „Functional Genome Analysis“ durchgeführt

3.4. Mausversuche

Alle Xenograft-*in vivo* Versuche wurden durch die EPO GmbH in Berlin durchgeführt. Nach Zusendung der Zellen, fanden die Aufzucht, Vorbereitung, Injektionen, Messungen und Entnahme der Tumore mit anschließender Konservierung nach deren Protokoll statt. Der verwendete Mausstamm ist NMRI-*Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}*.

3.5. Statistische Auswertung

Für alle numerischen Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängig reproduzierten Experimenten wurden die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) berechnet. Die Graphen wurden mit GraphPad PRISM erstellt. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde entweder ein einseitiger, ungepaarter Student's *t*-test verwendet oder der Man-Whitney-Test. Dabei wurde ein Wert von $p < 0,05$ als signifikant (*) über $p < 0,01$ (**) bis $p < 0,001$ als hoch signifikant (***) betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Der shRNA-Screen

In Kooperation mit der AG Hoheisel, Abteilung „*Functional Genome Analysis*“, am DKFZ Heidelberg wurde ein shRNA-Screen durchgeführt. Der Screen erfolgte mit der „*Deciper-shRNA Library*“ von Collecta und wurde in einer einzelnen Zellpopulation mit einer heterogenen Mischung von shRNAs durchgeführt. Jedes Gen wurde dabei von mehreren verschiedenen individuellen shRNAs abgedeckt. Durch die Verwendung von mehreren shRNAs pro Gen, können *off-target*-Effekte besser erkannt und die spezifischen Funktionen identifiziert werden.

Die Barcode-markierte shRNA-Library wurde in Lentiviren verpackt und BxPC3-Zellen damit transduziert. Nach einer kurzen Selektion mit Puromycin, um nicht transduzierte Zellen aus der Kultur zu entfernen, wurde die gesamte Zellpopulation mittels der Hochdurchsatzsequenzierung im Illumina HiSeq®-system sequenziert., wodurch alle stabil integrierten shRNAs in den Zellen identifiziert wurden.

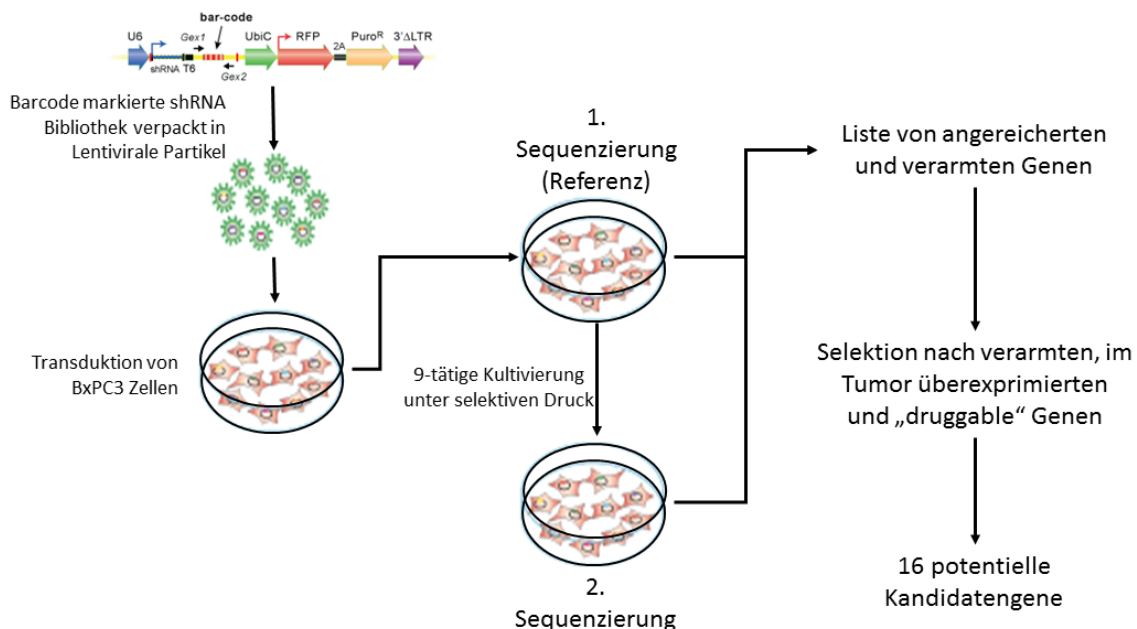


Abbildung 4-1 Schematische Darstellung der Identifizierung der Kandidatengene.

BxPC3-Zellen wurden mit einer Barcode markierten shRNA-Library transduziert. Vor und nach einer 9- tägigen Kultivierung wurde der Zellpool sequenziert. Die erhaltene Genliste wurde nach „druggable Genes“ selektiert wodurch 16 potentielle Kandidaten ermittelt wurden.

Nach weiteren neun Tagen Kultivierung, wurde die gesamte Population erneut sequenziert um Unterschiede in den integrierten shRNAs festzustellen. Dabei wurden Gene identifiziert, deren Verlust zum Absterben der Zelle führt. Um *off-Target*-Effekte weitestgehend auszuschließen wurden nur die Gene berücksichtigt, bei denen mindestens drei genspezifischen shRNAs (collecta ID) zur Letalität führte. Diese Liste von überlebenswichtigen Genen wurde auf „*druggable genes*“ überprüft. Als „*druggable genes*“ zählen Gene, die Proteine kodieren, deren enzymatische Funktion prinzipiell mit kleinen synthetischen Molekülen inhibiert werden können. Nach diesem Selektionsverfahren konnte eine endgültige Liste mit 16 potentiellen Kandidatengenen zusammengestellt werden (Tabelle 4-1) (Abbildung 4-1)

Tabelle 4-1 Liste der potentiellen Kandidatengene

	Collecta ID	Gensymbol	Gen ID			Collecta ID	Gensymbol	Gen ID
1	CLL-H-049707 CLL-H-049708 CLL-H-049709 CLL-H-049711 CLL-H-049710	SMC2	10592		9	CLL-H-045957 CLL-H-045955 CLL-H-045959	PTPN23	25930
2	CLL-H-035753 CLL-H-035754 CLL-H-035752 CLL-H-035755	GSTP1	2935		10	CLL-H-032831 CLL-H-032830 CLL-H-032827	DTL	51514
3	CLL-H-053393 CLL-H-053390 CLL-H-053392 CLL-H-053391	USP5	8078		11	CLL-H-028474 CLL-H-028573 CLL-H-028475	ARHGAP10	79658
4	CLL-H-044118 CLL-H-044115 CLL-H-044116	PFAS	5198		12	CLL-H-050482 CLL-H-050486 CLL-H-050485	STK3	6788
5	CLL-H-046473 CLL-H-046475 CLL-H-046471	RAE1	8480		13	CLL-H-048171 CLL-H-048172 CLL-H-048175	SEPHS2	22928
6	CLL-H-052434 CLL-H-052436 CLL-H-052433	TRIP13	9319		14	CLL-H-053224 CLL-H-053225 CLL-H-053227	UPF2	26019
7	CLL-H-030361 CLL-H-030365 CLL-H-030364	CCT2	10576		15	CLL-H-032281 CLL-H-032282 CLL-H-032284	DECR2	26063
8	CLL-H-028010 CLL-H-028007 CLL-H-028006	AHCYL1	10768		16	CLL-H-040001 CLL-H-040000 CLL-H-039999	MRPS11	64963

Aus dieser Liste wurden einige Gene ausgewählt, deren Expression in primären Geweben und Zelllinien bestimmt wurde, um potentielle Kandidaten mit Tumorspezifischer Expression für eine genaue Charakterisierung zu identifizieren.

4.2. Die Validierung des shRNA-Screens

Die mRNA Level von *AHCYL1*, *PFAS*, *GSTP1*, *SMC2*, *RAE1* *USP5* und *TRIP13* wurden in primären duktalem Adenokarzinomen des Pankreas (PDAC) und chronischer Pankreatitis mittels quantitativer Realtime PCR bestimmt und mit dem Expressionslevel von gesunden Gewebeproben verglichen. Insgesamt wurden zehn Tumormproben, sechs Proben der chronischen Pankreatitis und acht Proben gesunden Pankreasgewebes untersucht. Neben *SMC2* und *USP5* zeigte auch *GSTP1* und *TRIP13* eine signifikant höhere Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu den gesunden Geweben. Verglichen mit den Geweben der chronischen Pankreatitis, war nur *SMC2* signifikant erhöht. (Abbildung 4-2, Abbildung 4-3) Zusätzlich zeigten alle überprüften Gene eine Expression, sowohl in den getesteten transformierten Zelllinien, als auch in der nicht-transformierten (HEK293) (Abbildung 4-3).

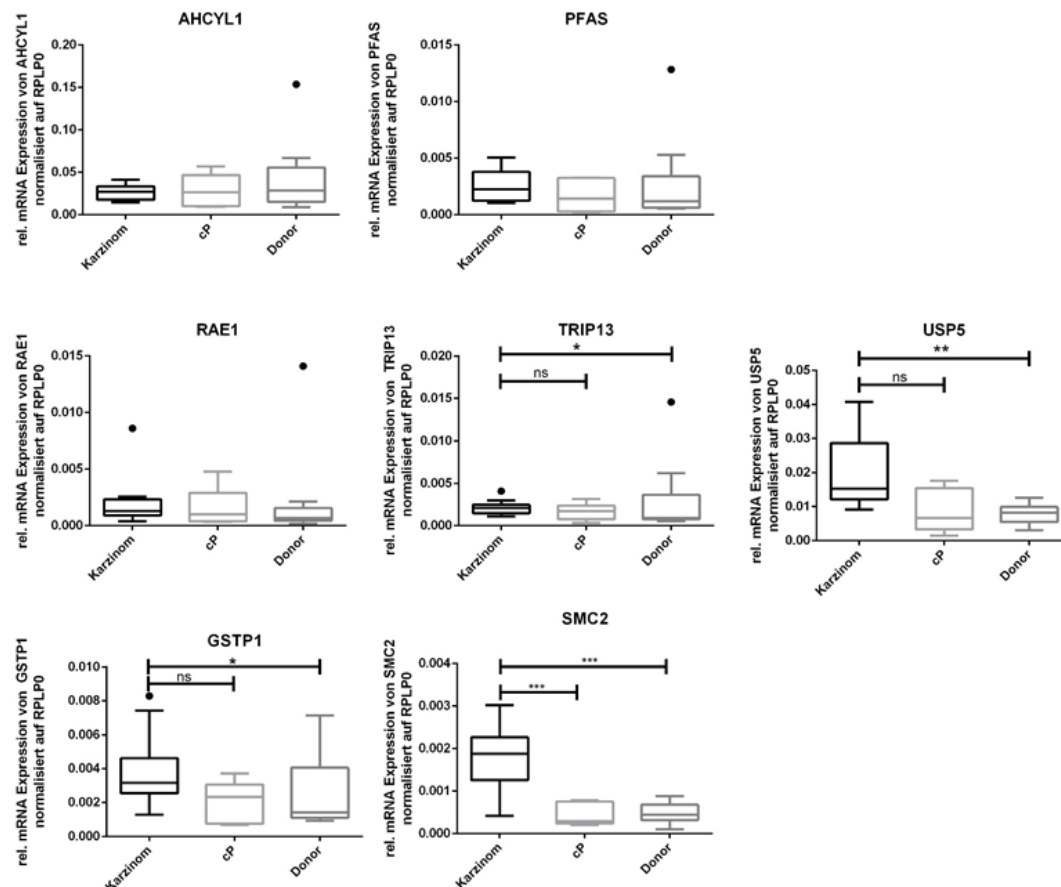


Abbildung 4-2 Expression von *AHCYL1*, *PFAS*, *RAE1*, *TRIP13*, *USP5*, *GSTP1* und *SMC2* in primären humanen Gewebeproben

Die relative mRNA-Expression für *AHCYL1*, *PFAS*, *RAE1*, *TRIP13*, *USP5*, *GSTP1* und *SMC2* wurde in je 10 Proben PDAC, 8 Proben chronischer Pankreatitis und 6 Proben gesundem Gewebe mittels qRT-PCR gemessen und auf das ribosomale Protein, large, P0 (*RPLP0*) normalisiert. Die Boxplots, nach Tukey, repräsentieren den Median, sowie das obere und untere Quartil mit den Whiskers. Kreise (•) kennzeichnen statistische Ausreißer. Sternchen (*) repräsentieren Signifikanzunterschiede (Mann-Whitney-Test): **p < 0,01; ***p < 0,001, ns = nicht signifikant. Karzinom = PDAC, cP = chronische Pankreatitis, Donor = gesundes Gewebe

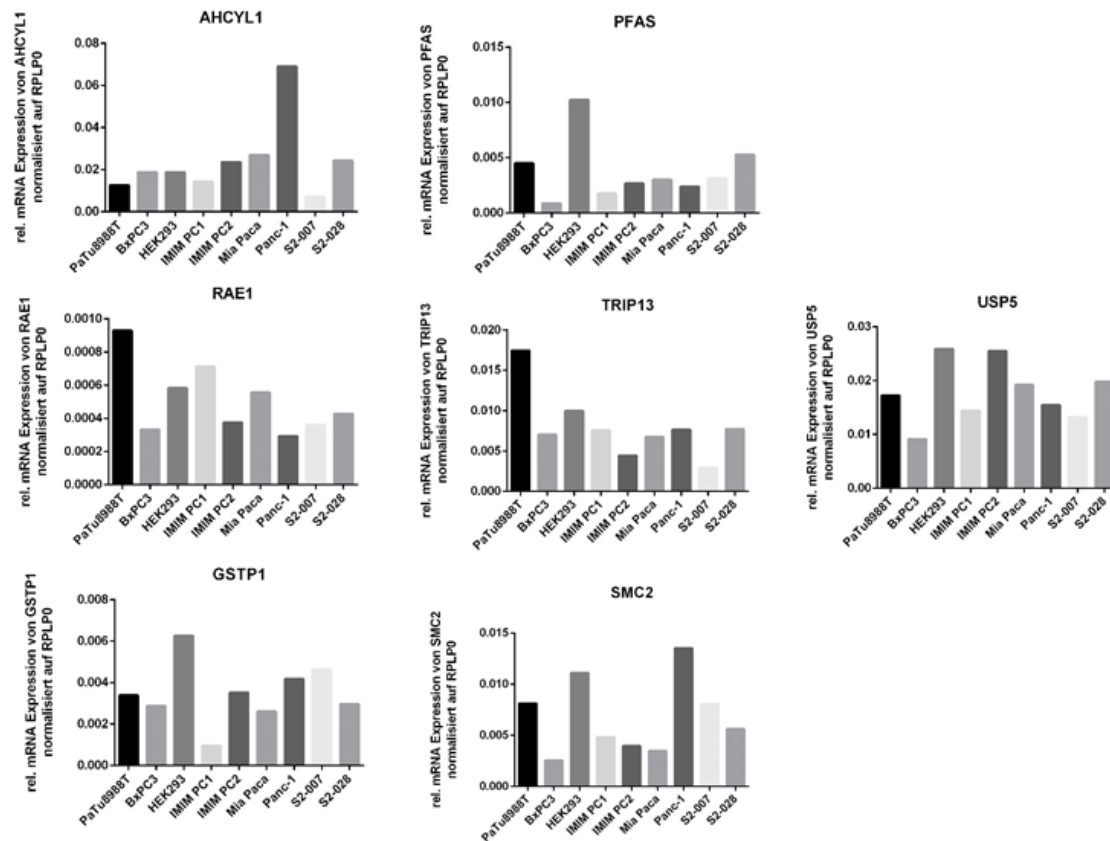


Abbildung 4-3 Expression von *AHCYL1*, *PFAS*, *RAE1*, *TRIP13*, *USP5*, *GSTP1* und *SMC2* in Zelllinien

Das relative mRNA-Expression für *AHCYL1*, *PFAS*, *RAE1*, *TRIP13*, *USP5*, *GSTP1* und *SMC2* wurde in verschiedenen humanen pankreatischen Tumorzelllinien und der nicht transformierten Zelllinie HEK293 mittels qRT-PCR gemessen und auf das ribosomale Protein, large, P0 (*RPLP0*) normalisiert.

In den weiteren Versuchen wurden *SMC2* und *USP5* genauer charakterisiert.

4.3. Das Gen *SMC2*

4.3.1. *SMC2* ist essentiell für die Proliferation und Vitalität von Pankreaskarzinomzellen

Um beurteilen zu können, welche funktionelle Relevanz die Überexpression im Pankreaskarzinom hat, wurde *SMC2* mittels zweier verschiedener siRNAs reprimiert. Beide siRNAs generierten einen signifikanten *Knockdown* in den verwendeten pankreatischen Tumorzelllinien PaTu8988T, Panc-1, IMIM PC2 und S2-007. Der *Knockdown* wurde auf transkriptioneller Ebene mit Hilfe der qRT-PCR überprüft und war zwischen 24 Stunden und mindestens 72 Stunden nachweisbar (Abbildung 4-4 A).

Die Auswirkung des proliferativen Potentials, auf Zellen mit und ohne *SMC2*, wurde mittels eines BrdU-Assays untersucht. In PaTu8988T-, Panc-1 und IMIM PC2-Zellen konnte 72 Stunden nach der Transfektion, im Vergleich zu der siRNA Kontrolle (si ctrl) oder unbehandelten Zellen (ctrl), mit spezifischer siRNA gegen *SMC2* gehemmten Zellen, eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate beobachtet werden. Dabei war die Proliferationsrate in Panc1-Zellen bis zu 70 % reduziert, während in PaTu8988T und IMIM PC2-Zellen die Teilungsrate um etwa 50 % reduziert war. In S2-007 konnte in beiden Fällen eine Reduktion der Proliferationsrate bis zu 35 % erreicht werden, eine statistische Signifikanz erreichte jedoch nur die Zellen, die mit siRNA #2 behandelt wurden (Abbildung 4-4 B).

Zusätzlich zur Analyse der Zellproliferation wurde auch der Einfluss der RNA-Interferenz auf die Anzahl der vitalen Zellen im MTT-Assay gemessen. In allen vier verwendeten Tumorzelllinien war 72 Stunden nach der Transfektion, verglichen mit den Kontrollen, eine signifikante Reduktion der Vitalität zwischen 20 und 60 % in den *SMC2-Knockdown* Zellen messbar (Abbildung 4-4 C).

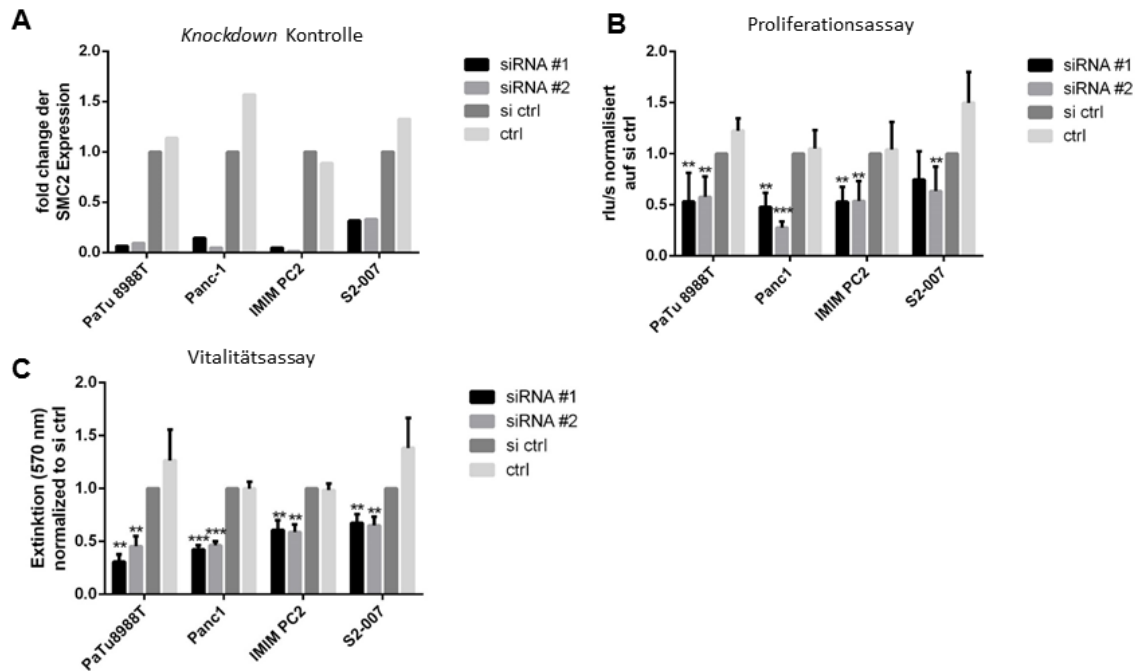


Abbildung 4-4 *Knockdown* von *SMC2* führte zur Reduktion der Proliferation und Vitalität von Pankreaskarzinomzelllinien

(A) qRT-PCR Analyse des *Knockdowns* von *SMC2* auf mRNA-Ebene 24 Stunden nach der Transfektion der Pankreaskarzinomzelllinien PaTu-8988T, Panc-1, IMIM PC2 und S2-007 normalisiert auf die Expression von *RPLP0*. Dargestellt ist der *fold change* der *SMC2*-Expression, im Vergleich zur si ctrl-Zellen. (B) BrdU-Assay nach dem *Knockdown* von *SMC2* angegeben in rlu/s (relative lights per second). 48 Stunden nach der *SMC2*-Repression, war die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien signifikant beeinträchtigt. Normiert wurde auf die si-Kontrolle. (C) Im MTT-Assay war eine signifikante Abnahme der Extinktion durch spezifische siRNAs nach 72 Stunden in den verwendeten Tumorzelllinien messbar. Die Normalisierung erfolgte auf die si-Kontrolle. Alle Ergebnisse wurden mit mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt und mit Standardabweichung dargestellt. si ctrl= transfiziert mit *non-Silencing* Kontrolle, ctrl = unbehandelt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Student's *t*-Test)

Um zu überprüfen, ob der *Knockdown* von *SMC2* allgemein zytotoxisch, oder spezifisch auf transformierte Zellen wirkt, wurde als Kontrolle HEK293-Zellen verwendet. Wie in Abbildung 4-5 dargestellt, war der *Knockdown* von *SMC2* in HEK293-Zellen ebenfalls sehr effizient, erzeugte jedoch weder im BrdU- noch im MTT-Assay eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate bzw. der Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen.

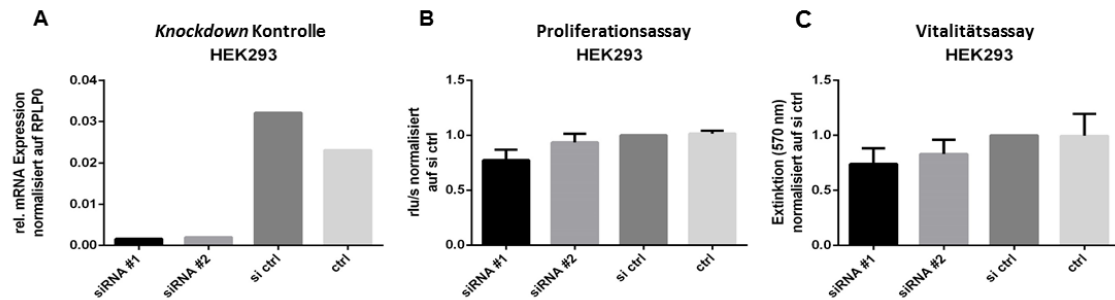


Abbildung 4-5 in HEK293 führte die Repression von *SMC2* zu keiner signifikanten Änderung der Proliferation oder der Zellvitalität

(A) Für die Bestimmung der *Knockdown*-Effizienz wurde mittels qRT-PCR die relative *SMC2*-Expression 24h nach der Transfektion mit siRNAs bestimmt. (B) Der *Knockdown* von *SMC2* beeinträchtigte die Proliferation der nicht transformierten Zelllinie HEK293 im BrdU-Assay nicht signifikant. Dargestellt sind die relativen Licht-Einheiten (rlu/s) aus drei verschiedenen Experimenten 48 Stunden nach der Transfektion. Normalisiert wurde auf si-Kontrolle. (C) Im MTT-Assay war in der Extinktion bei 570 nm nach 72 Stunden keine signifikante Abnahme der vitalen Zellen durch siRNAs in HEK293 messbar. Die Normalisierung erfolgte auf die si-Kontrolle. Die Standardabweichung wurde aus mindestens drei Experimenten ermittelt. si ctrl= transfiziert mit non-*Silencing* Kontrolle, ctrl = unbehandelt.

Die Fähigkeit zum Wachstum ohne die Anhaftung an eine feste Oberfläche, ist ein wesentliches Kennzeichen von maligne transformierten epithelialen Tumorzellen. Die Möglichkeit des substratunabhängigen Wachstums von Zellen, korreliert mit dem invasiven und metastatischen Potenzial des Tumors. Im Soft-Agar-Assay war, nach der *SMC2*-Repression und 9 Tagen Kultivierung der Zellen im Soft-Agar, in den beiden Zelllinien PaTu8988T und Panc-1, die Anzahl der Kolonien bis zu 80 % verringert (Abbildung 4-6 A). Betrachtet man die Koloniegröße, die in Abbildung 4-6 B für PaTu8988T-Zellen exemplarisch dargestellt wurde, so zeigt sich auch hier, dass die Runterregulation von *SMC2* ebenso die Größe der Kolonien beeinflusst.

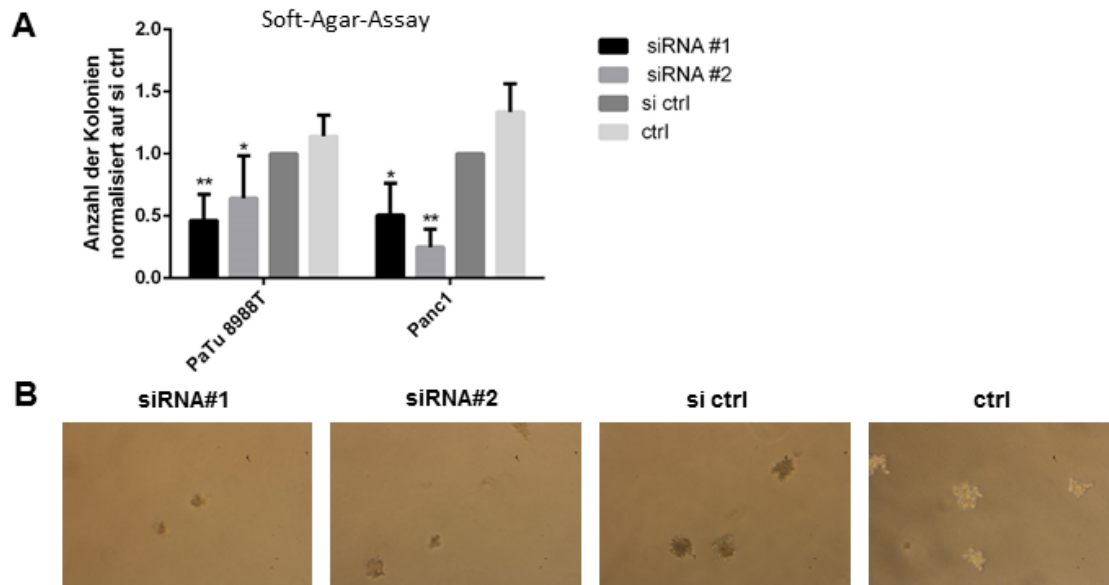


Abbildung 4-6 Die Hemmung der *SMC2*-Expression in PaTu8988T- und Panc-1-Zellen führte zu verminderten Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum

(A) Soft-Agar-Assays zeigten in PaTu8988T und Panc-1 Zellen, verglichen mit den Kontrollen, nach 9 Tagen Kultivierung unter nicht-adhären Bedingungen, eine signifikant geringere Koloniezahl. Die Normalisierung erfolgte auf die si-Kontrolle. Die Standardabweichung wurde aus jeweils drei unabhängigen Experimenten ermittelt. (B) Exemplarische Darstellung der Koloniegröße von PaTu8988T im Soft-Agar-Assay. si ctrl= transfiziert mit non-*Silencing* Kontrolle, ctrl = unbehandelt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Student's *t*-Test)

4.3.2. *SMC2* hat keinen Einfluss auf die Mobilität der Zellen

Ein weiteres relevantes Merkmal von epithelialen Tumorzellen ist die erhöhte Fähigkeit der Zellen zur Migration. Der Einfluss von *SMC2* auf die Mobilität von PaTu8988T Zellen wurde in *Time-Lapse*-Analysen gemessen. 48 Stunden nach der Transfektion mit spezifischer und unspezifische siRNA wurden die Zellen im *Time-Lapse*-Mikroskop über einen Zeitraum von 16 bis 20 Stunden beobachtet und in regelmäßigen Abständen Bilder der Zellpopulationen aufgenommen. Aus der automatisierten Analyse, der Beweglichkeit individueller Zellen, wurden anschließend mittlere Wandergeschwindigkeiten für behandelte und kontrollbehandelte Populationen ermittelt. Eine Repression der *SMC2* Expression, führte im Vergleich zu den Kontrollen, zu keiner Veränderung im Migrationsverhalten der Zellen (Abbildung 4-7).

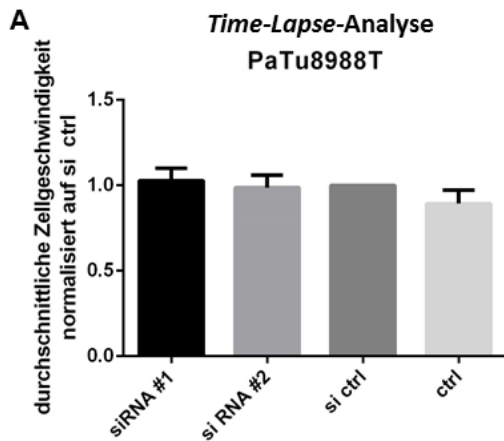


Abbildung 4-7 Der *SMC2-Knockdown* hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von PaTu8988T-Zellen

(A) *Time-Lapse-Analysen* von PaTu8988T-Zellen 48 Stunden nach Transfektion der siRNAs. Dargestellt ist die durchschnittliche Zellgeschwindigkeit aus drei Experimenten normalisiert auf die si Kontrolle. si ctrl= transfiziert mit non-*Silencing* Kontrolle, ctrl = unbehandelt

4.3.3. *SMC2* hat einen moderaten Einfluss auf den Zellzyklus

Um aufzuklären, über welche Mechanismen und Signalwege die Repression von *SMC2* zu einer Reduktion der Proliferation und Vitalität der Zellen führt, wurden 48 Stunden nach der Transfektion Zellzyklusanalysen in Form von durchflusszytometrischen Messungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass in PaTu8988T-Zellen lediglich durch siRNA #2 ein nennenswerter Anstieg der Zellen in der G1-Phase und eine leicht verringerte Anzahl an Zellen in der S-Phase ausgelöst wurde (Abbildung 4-8 A), obwohl im BrdU-Assay beide siRNAs ähnliche Ergebnisse geliefert hatten (s. Abbildung 4-4 B). Durch siRNA #1 konnte nur ein geringer G1-Phasen Anstieg von 8% nachgewiesen werden. In der Analyse von Zellzyklusregulatoren im Westernblot, konnte 24 Stunden nach dem *Knockdown* von *SMC2*, keine Regulation in Cyclin D1, einem Kontrollgen des G1/S Phase-Übergangs, festgestellt werden. Auch in den Zellzyklusregulatoren Cyclin A und B1 konnten keine Unterschiede detektiert werden, wodurch die Daten der durchflusszytometrischen Analysen, die keine starke Regulation des Zellzyklus zeigten, bestätigt wurden (Abbildung 4-8 B).

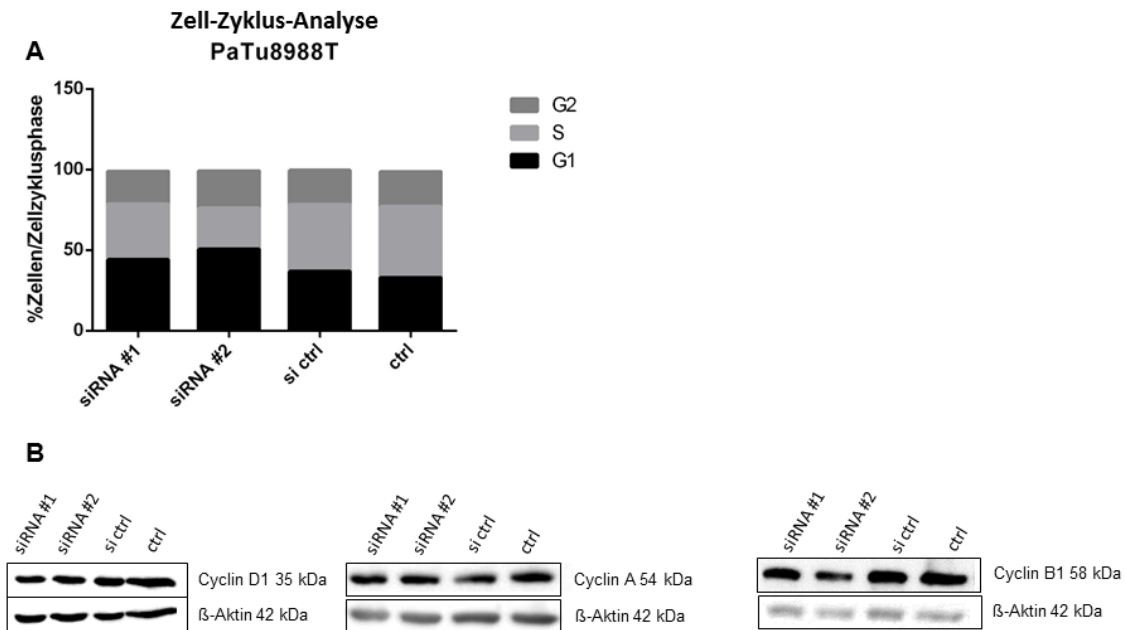


Abbildung 4-8 Der *SMC2-Knockdown* führte zu einem moderaten Einfluss auf den Zellzyklus

(A) Zellzyklusanalyse von PaTu8988t-Zellen, 48 Stunden nach Transfektion. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen. (B) Validierung der Zellzyklusanalyse 24 Stunden nach der Transfektion im Westernblot. Detektion von Cyclin D1, Cyclin A und Cyclin B1. Alle Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. si ctrl = transfiziert mit non-*Silencing* Kontrolle, ctrl = unbehandelt

4.3.4. DNA-Brüche führen zur Aktivierung von *p21/CDKN1A* und Apoptose

Der nur schwach ausgeprägte Anstieg der Zellen in der G1 Phase konnte die starke Reduktion im proliferativen Potential der Zellen ohne SMC2 nicht erklären. Deshalb wurden die Zellen auf Apoptose-Signale untersucht. Caspase-3 und PARP werden im Verlauf der Einleitung apoptotischer Vorgänge in der Zelle gespalten und dienen somit als spezifische Apoptose-Marker. In Zelllysaten mit und ohne Hemmung der *SMC2*-Expression wurden die Proteinlevel von Caspase-3 und PARP, sowie deren Spaltprodukte analysiert. Die deutliche Caspase-3 und PARP Spaltung, 48 Stunden nach *SMC2-Knockdown* in den pankreatischen Tumorzelllinien PaTu8988T und Panc-1, waren Indizien für eine Aktivierung des Apoptose-Signalwegs (Abbildung 4-9).

Um nachvollziehen zu können, wodurch die Apoptose ausgelöst wird, wurde 48 Stunden nach der Transfektion im Westernblot der Indikator für Doppelstrangbrüche pH2AX untersucht. Dabei zeigte sich, dass in PaTu8988T und Panc-1 Zellen ohne SMC2 eine deutliche Hochregulation von pH2AX, verglichen mit den Kontrollen, vorhanden ist. Bereits 24 Stunden nach der Transfektion wurde, durch die RNA-Interferenz, der

Zellzyklusregulator *p21/CDKN1A* in den Zelllinien PaTu8988T und Panc-1 hochreguliert (Abbildung 4-9). Dieses Gen reguliert die Interaktion zwischen PARP und BER (*base excision repair*) Faktoren und unterstützt somit DNA Reparatur.

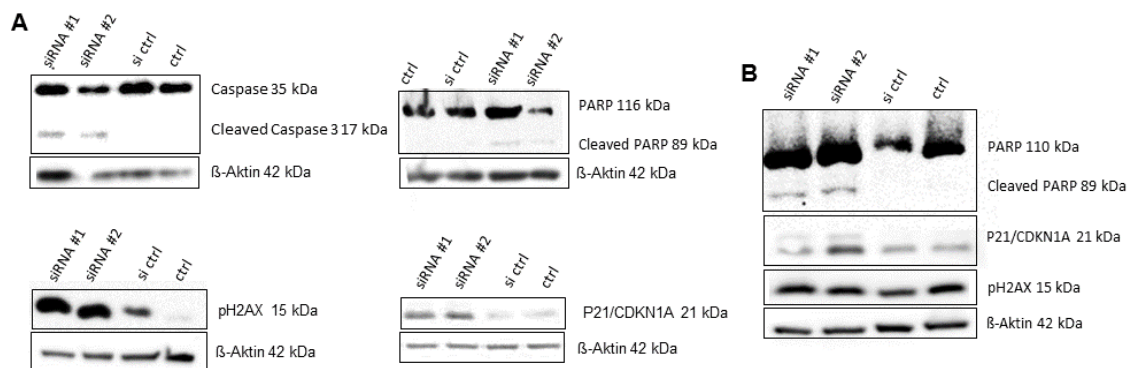


Abbildung 4-9 SMC2-Knockdown induzierte Apoptose durch DNA- Doppelstrangbrüche

(A-B) pH2AX, PARP, cleaved-PARP und /oder Caspase-3 und cleaved-Caspase-3 Level wurden im Westernblot nach 48 Stunden in (A) PaTu8988T und (B) Panc-1 Zellen nachgewiesen. p21/CDKN1A wurde nach 24 Stunden im Westernblot detektiert. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. si ctrl= transfiziert mit non-Silencing Kontrolle, ctrl = unbehandelt

4.3.5. SMC2 wird durch WNT5A reguliert

Bereits veröffentlichte Daten zeigten einen Zusammenhang zwischen SMC2 und dem WNT-Signalweg im Kolonkarzinom. Zusätzlich war im Pankreaskarzinom, ein tumorfördernder Einfluss des WNT5A Liganden, auf das Überleben von Pankreaskarzinomzellen vorbeschrieben. Deshalb wurde der Einfluss des WNT5A-Signalwegs auf die SMC2-Expression, mittels RNA-Interferenz überprüft. Dafür wurde, mittels zwei verschiedenen spezifischen siRNAs, WNT5A in PaTu8988T-Zellen reprimiert (Abbildung 4-10 A). Gleichzeitig wurde das Expressionslevel von SMC2, 72 Stunden nach der Transfektion, in diesen Zellen mit einer qRT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt eine signifikante Reduktion der SMC2 Expression in den WNT5A reprimierten Zellen (Abbildung 4-10 B).

Für die Evaluierung des Ergebnisses der Regulation von SMC2 durch WNT5A wurden Westernblots gegen pH2AX und p21/CDKN1A in den WNT5A reprimierten Zellen durchgeführt. Dadurch sollte überprüft werden, ob der Knockdown von WNT5A nach 72 Stunden denselben zellulären Effekt auf PaTu8988T auslöst, wie der Knockdown von SMC2. Nach der siRNA Transfektion gegen WNT5A, wurden, wie bereits zuvor nach direktem SMC2-Knockdown beobachtet, der Doppelstrangbruchmarker pH2AX und der Zellzyklusregulator p21/CDKN1A in PaTu-8988T-Zellen hochreguliert (Abbildung 4-10 C).

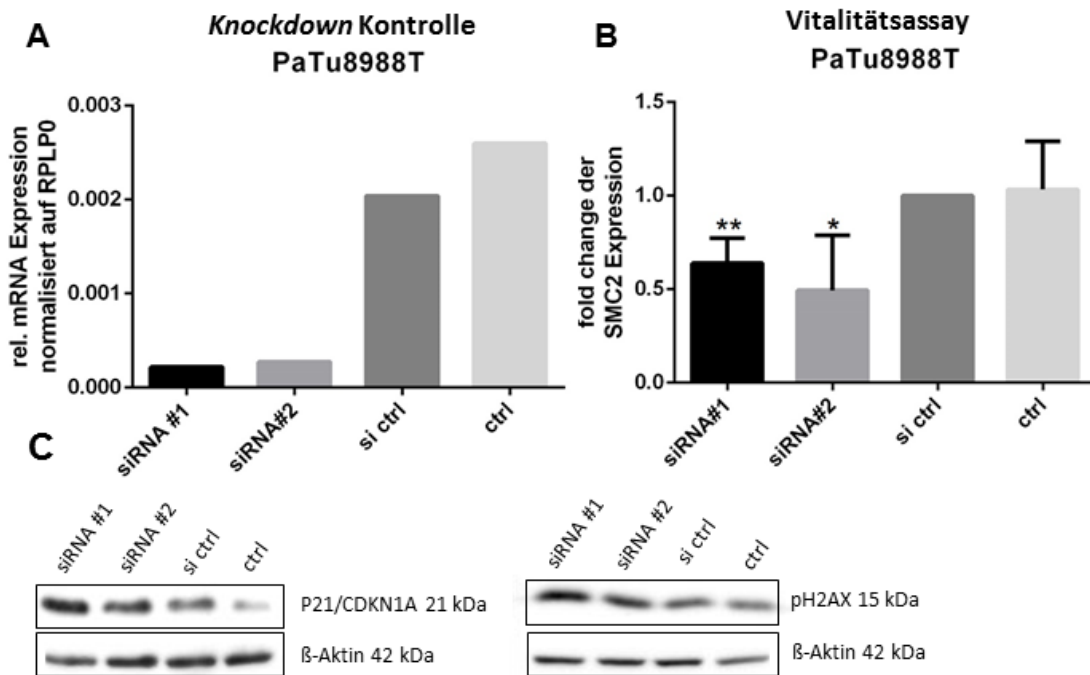


Abbildung 4-10 *WNT5A* regulierte *SMC2* auf mRNA-Ebene

(A) qRT-PCR nach 72 Stunden zur Analyse der transienten Transfektionseffizienz der beiden siRNAs gegen *WNT5A*. Die relative mRNA-Expression wurde auf *RPLP0* normalisiert. (B) qRT-PCR auf *SMC2* in PaTu8988T-Zellen 72 Stunden nach *Knockdown* von *WNT5A*. Dargestellt ist der fold change der *SMC2*-Expression im Vergleich zu si ctrl. (C) Die Proteinlevel von p21/CDKN1A, p2AX wurden im Westernblot, 72 Stunden nach transientem *Knockdown* von *WNT5A*, evaluiert. Alle Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. si ctrl= transfiziert mit non-Silencing Kontrolle, ctrl = unbehandelt

4.3.6. *SMC2*-Knockdown reduziert das Tumorstadium *in vivo*

Nachdem die siRNA-Experimente *in vitro* einen regulatorischen Effekt von *SMC2* auf die Proliferation, Vitalität und das substratunabhängige Wachstum der Zellen zeigte, sollten diese Effekte *in vivo* validiert werden. Hierfür wurden zwei unabhängige Tetracyclin-induzierbaren shRNA-Konstrukte in pLKO-Vektoren hergestellt. Für die *in vivo* Studie muss die Expression der shRNA über einen langen Zeitraum aufrechterhalten werden, weshalb die Konstrukte mittels einer lentiviralen Transduktion und anschließender Puromycin-Selektion ins Genom der PaTu8988T-Zellen integriert wurden. Die Klone der beiden verwendeten shRNA-Konstrukte, wurden vor Beginn der *in vivo* Experimente auf ihre Funktionalität getestet. Dafür wurden die Zellen 5 Tage mit und ohne 2mg/ml Doxycyclin kultiviert und anschließend im MTT-Assay die Vitalität der Zellen bestimmt. In Abbildung 4-11 A ist ein messbarer Rückgang, zwischen 35 und 80 %, nach Zugabe von Doxycyclin im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu sehen.

In Kooperation mit der *Experimental Pharmacology and Oncology* (EPO) GmbH in Berlin wurden beide stabil transfizierten Zellklone in die rechte Flanke von jeweils 12

athymischen Nacktmäusen injiziert und über einen Zeitraum von 69 Tagen die Tumorgroße bestimmt. Durch die Gabe von 2 mg/ml Doxycyclin mit dem Trinkwasser, wurde die shRNA-Expression in jeweils der Hälfte der injizierten Tiere (n=6) aktiviert. Das Tumorwachstum konnte durch die shRNA-Aktivierung zwar verringert werden, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 4-11 B). Aus diesem Grunde wurde nach Abschluss des Versuches die Expression von *SMC2* in den Tumoren mit Hilfe einer qRT-PCR bestimmt. Die Daten zeigen einen signifikanten *Knockdown* von *SMC2* in den, mit Doxycyclin behandelten Mäusen (Abbildung 4-11 C).

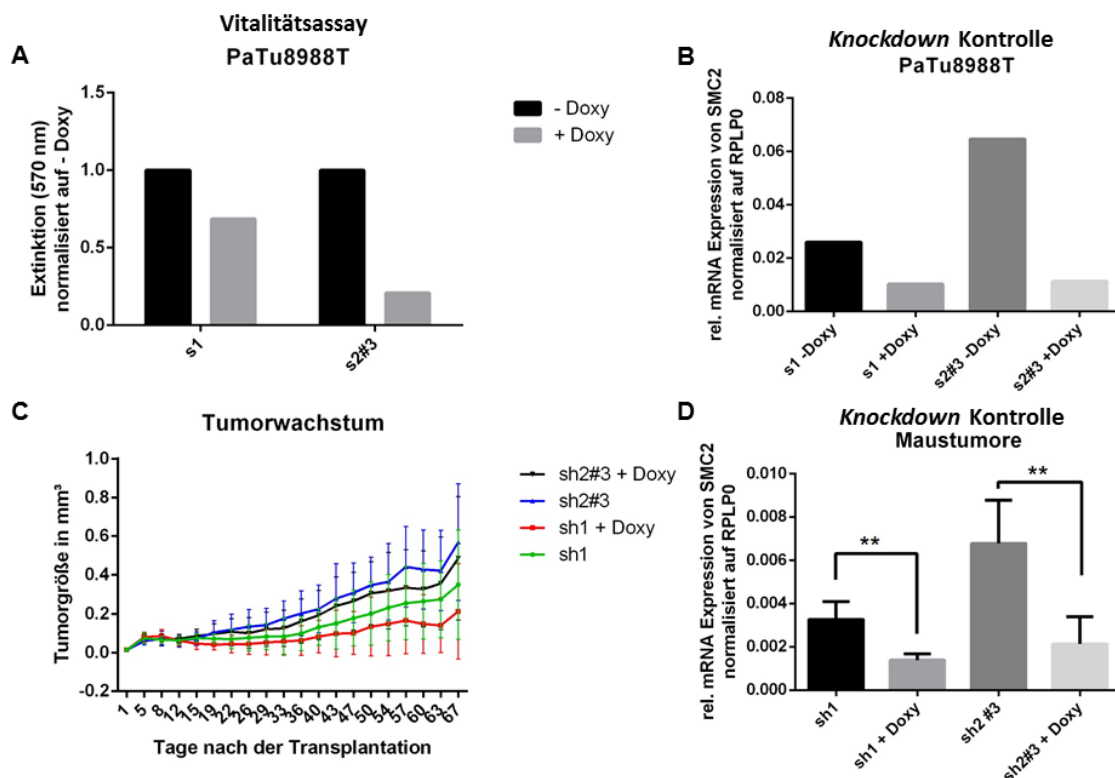


Abbildung 4-11 Im Xenograft Mausmodell mit induzierbaren PaTu8988T-Klonen waren keine signifikanten Wachstumsunterschiede durch *SMC2* messbar

(A) MTT-Assay mit stabilen shRNA-Klonen nach einer 5-tägigen Behandlung mit und ohne 2 mg/ml Doxycyclin. Dargestellt wurde die Extinktion bei 570 nm aus drei unabhängigen Experimenten, normalisiert auf die Population ohne Doxycyclin-Behandlung. (B) qRT-PCR zur Überprüfung des *SMC2* *Knockdowns* des MTT-Assays. Die relative Expression von *SMC2* wurde auf *RPLP0* normalisiert. (C) Tumorgrowth in athymischen Nacktmäusen, mit und ohne Doxycyclin-Behandlung, während der Versuchsdauer von 67 Wochen. Jede Gruppe bestand aus 12 Tieren. Zunahme der Tumorgroße gemessen in mm³. (D) qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression von *SMC2* in den isolierten Xenografttumoren. Dargestellt wurde die relative Expression von *SMC2* normalisiert auf *RPLP0*. **p<0,01 (Student's t-Test)

4.4. Das Gen *USP5*

4.4.1. *USP5* ist essentiell für die Proliferation und Vitalität von Pankreaskarzinomzellen

Um die funktionelle Bedeutung der Überexpression von *USP5* im Pankreaskarzinom zu untersuchen, wurde mit drei verschiedenen siRNAs die Expression von *USP5*-reprimiert. In den vier verwendeten Tumorzelllinien PaTu8988T, Panc-1, IMIM PC2 und S2-007, wurde mit allen siRNAs ein signifikanter *Knockdown* generiert. Auf transkriptioneller Ebene konnte, mittels qRT-PCR zwischen 24 und mindestens 72 Stunden, einen *Knockdown* zwischen 60 und 95 % nachgewiesen werden (Abbildung 4-12 A).

Der Effekt des *Knockdowns* von *USP5* auf das proliferative Potential der Zellen wurde in einem BrdU-Assay bestimmt. Durch die drei siRNAs wurde im Vergleich zu den Kontrollen, in drei der vier verwendeten Tumorzelllinien, PaTu8988T, Panc-1 und IMIM PC2, eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate zwischen 45 und 60 % gemessen (Abbildung 4-12 B). In S2-007 konnte durch alle drei siRNAs eine Reduktion der Proliferation erzeugt werden, jedoch erreichte nur die Transfektion mit siRNA #2 und #3 eine signifikante Abnahme der Teilungsrate im Vergleich zu den Kontrollen.

Zusätzlich zur Zellproliferation wurde im MTT-Assay die Auswirkung der *USP5*-Repression auf die Vitalität der Zellen bestimmt. In den *USP5*-reprimierten Zellen der Linien PaTu8988T, Panc-1 und IMIM PC2, war eine statistisch signifikante Verminderung der Zellvitalität, verglichen mit den Kontrollen, zu sehen. Dabei reduzierte sich die Vitalität der Zellen zwischen 45 und 65 %. Auch in den S2-007-Zellen wurde eine Abnahme der Vitalität von 10 bis 30 % durch die drei verschiedenen siRNAs ausgelöst. Jedoch wurde durch siRNA #3 keine Signifikanz erreicht (Abbildung 4-12 C).

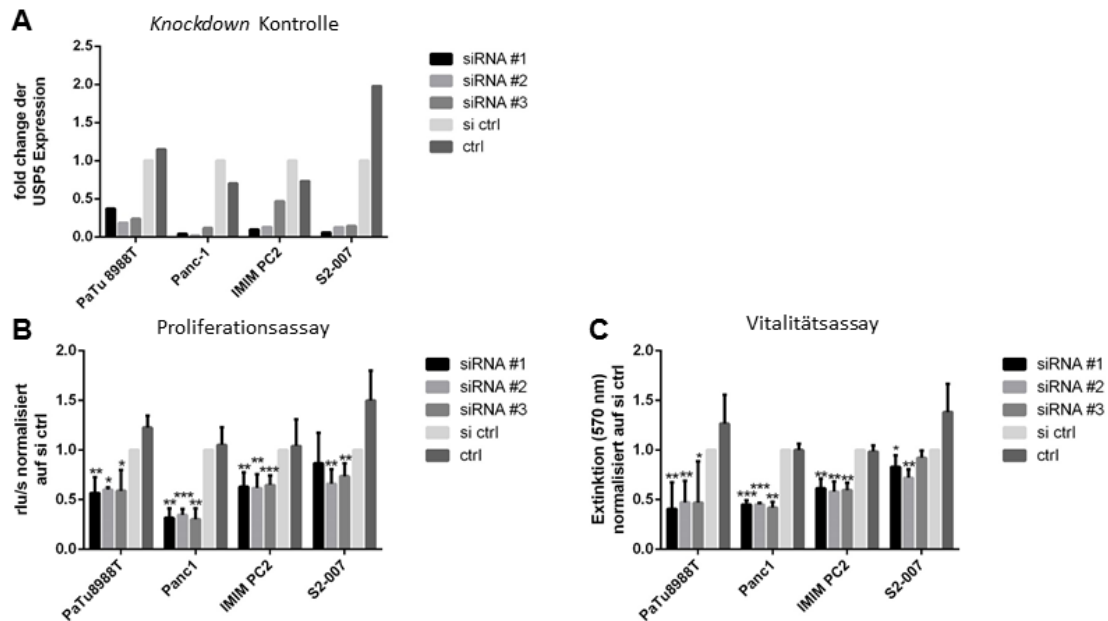


Abbildung 4-12 Der *Knockdown* von *USP5* führte zur Reduktion der Proliferation und Vitalität von Pankreaskarzinomzelllinien

(A) qRT-PCR Analyse des *USP5-Knockdowns* 24 Stunden nach der Transfektion. Dargestellt wurde der fold change der *USP5*-Expression im Vergleich zu si ctrl in den vier verwendeten Tumorzelllinien PaTu8988T, Panc-1, IMIM PC2 und S2-007. (B) Der BrdU-Assay zeigte die Abnahme des proliferativen Potentials von drei unabhängigen Versuchen 48 Stunden nach dem *USP5-Knockdown*. Die Grafik zeigt die Abnahme der relativen-Licht-Einheiten (rlu/s), normalisiert auf si-Kontrolle. (C) MTT-Assay nach *Knockdown* von *USP5*, angegeben wurde die Extinktion bei 570 nm. Dargestellt wurden die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, normalisiert auf die si-Kontrolle. si ctrl = transfiziert mit non-Silencing Kontrolle, ctrl = unbehandelt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Student's t-Test)

Um zu überprüfen, ob der Knockdown von *USP5* spezifisch auf transformierte Zellen wirkt, oder einen allgemein zytotoxischen Effekt hat, wurde eine nicht-transformierte Zelllinie (HEK293) als Kontrolle verwendet. In Abbildung 4-13 wird gezeigt, dass nach einem effizienten transienten *Knockdown* von *USP5* im BrdU-Assay eine signifikante Abnahme der Proliferation durch siRNA #2 und #3 nachgewiesen werden konnte. Auch im MTT-Test wurde, nach erfolgreichem *USP5-Knockdown*, durch alle drei verschiedenen siRNAs eine Reduktion der Vitalität gemessen. Durch die Transfektion der Zellen mit siRNA #2 wurde eine signifikante Abnahme der vitalen Zellen von 34 % gemessen (Abbildung 4-13).

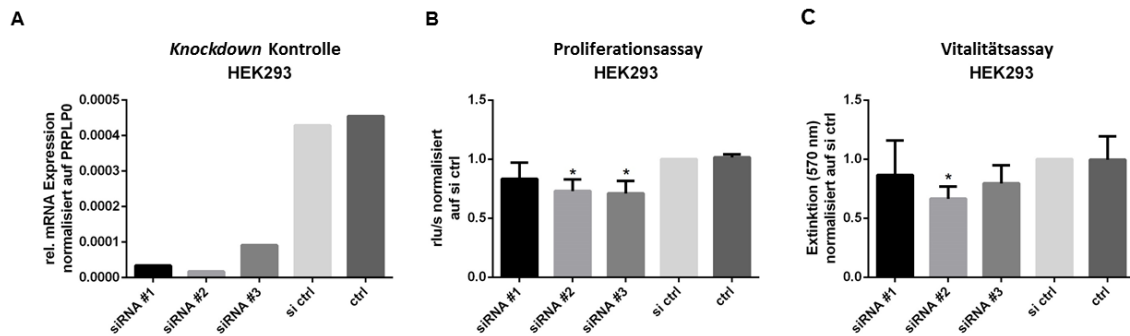


Abbildung 4-13 Die Repression von *USP5* führte in HEK293-Zellen zu einer Veränderten Proliferationsrate und Zellvitalität

(A) qRT-PCR zur Analyse der relativen mRNA-Expression von *USP5* 24 Stunden nach der Transfektion zur Überprüfung der Transfektionseffizienz. (B) Im BrdU-Assay beeinträchtigte der *Knockdown* von *USP5* die Proliferation nur durch siRNA #2 und #3. Dargestellt wurden die relativen Licht-Einheiten pro Sekunde (rlu/s) aus drei verschiedenen Experimenten 48 Stunden nach der Transfektion, normalisiert auf die si-Kontrolle. (C) Im MTT-Assay konnte eine signifikant verminderte Vitalität nur für siRNA #2 festgestellt werden. Die Darstellung basierte auf drei unabhängigen Experimenten und die Normalisierung erfolgte auf die si-Kontrolle. si ctrl = transfiziert mit non-Silencing Kontrolle, ctrl = unbehandelt. * $p < 0,05$ (Student's *t*-Test)

Eine erhöhte Fähigkeit zur Migration ist ein wesentliches Merkmal von malignen epithelialen Tumorzellen. Die Mobilität von Tumorzellen, durch den Einfluss von *USP5*, wurde in *Time-Lapse*-Analysen gemessen, indem 48 Stunden nach der RNA Interferenz, mit spezifischer und unspezifischer siRNA die Zellen im *Time-Lapse*-Mikroskop über einen Zeitraum von 16 bis 20 Stunden beobachtet und in regelmäßigen Abständen Bilder der Zellpopulation erstellt wurden. Um Unterschiede in der Wandergeschwindigkeit der Zellen zu ermitteln, wurde eine automatische Analyse der Beweglichkeit einzelner Zellen durchgeführt. Dabei führte der *Knockdown* von *USP5* in PaTu8988T-Zellen zu keinem signifikanten Unterschied in der Wandergeschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 4-14 A).

Ein weiteres Kennzeichen von malignen Tumorzellen, das substratunabhängige Wachstum, ist mit dem invasiven und metastatischen Potenzial des Tumors assoziiert. Im Soft-Agar-Assay wurde in der Abwesenheit von *USP5* in den Zellen (PaTu8988T und Panc-1), nach 9 Tagen Kultivierung, bis zu 60 % weniger Kolonien gezählt als in den Kontrollen (Abbildung 4-14 B). In Abbildung 4-14 C ist für PaTu8988T Zellen exemplarisch die Koloniegröße dargestellt. Betrachtet man diese, zeigt sich ein Einfluss auf die Koloniegröße nach dem *Knockdown* von *USP5*.

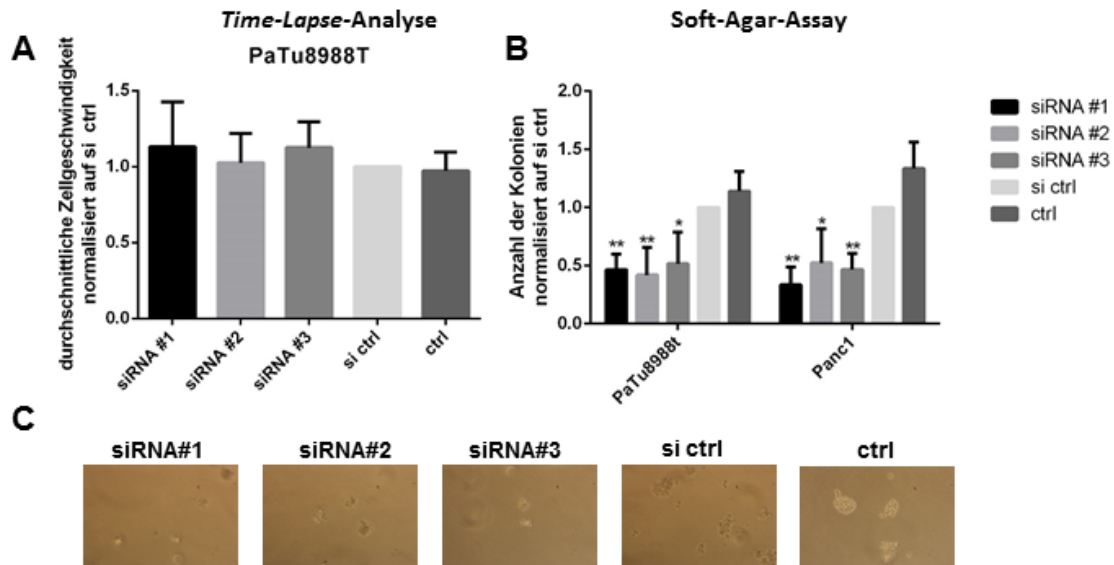


Abbildung 4-14 Der *USP5* Knockdown hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von PaTu8988T-Zellen, aber er vermindert die Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum

(A) Time-Lapse-Analysen von PaTu8988T-Zellen 48 Stunden nach Transfektion der siRNAs. Dargestellt ist die durchschnittliche Zellgeschwindigkeit aus drei Experimenten normalisiert auf die si-Kontrolle. (B) Soft-Agar-Assays zeigten, verglichen mit den Kontrollen, nach 9 Tagen Kultivierung unter nicht-adhärenenten Bedingungen, eine signifikant geringere Kolonieanzahl. Die Normalisierung erfolgte auf die si-Kontrolle. Die Standardabweichung wurde aus jeweils drei unabhängigen Experimenten ermittelt. (C) Die exemplarische Darstellung der Koloniegröße von PaTu8988T im Soft-Agar-Assay. si ctrl= transfiziert mit non-Silencing Kontrolle, ctrl = unbehandelt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Student's *t*-Test).

4.4.2. *USP5* beeinflusst den Zellzyklus

Anhaltspunkte für die regulatorischen Mechanismen, die zur Reduktion der Zellvitalität führen, lieferten durchflusszytometrische Messungen des Zellzyklus von PaTu8988T-Zellen. In der Abwesenheit von *USP5* war nach 48 Stunden für alle drei siRNAs ein homogener Zuwachs in der G1 Phase zwischen 15 % und 20 % und eine geringere Anzahl an Zellen in der S Phase verglichen mit den Kontrollen zu erkennen (Abbildung 4-15 A). Um dieses Ergebnis zu validieren, wurden Zellzyklusregulatoren im Westernblot untersucht. Dabei führte der der *Knockdown* von *USP5*, im Vergleich zu den Kontrollen, zu einer deutlichen Reduktion des Cyclin D1-Proteinlevels, dem Kontrollgen des G1/S Phasen-Übergangs. Die Kontrollgene Cyclin A und B1 der Zellzyklusphasen-Übergänge S/M bzw. M/G1 zeigten keine Regulation (Abbildung 4-15 B).

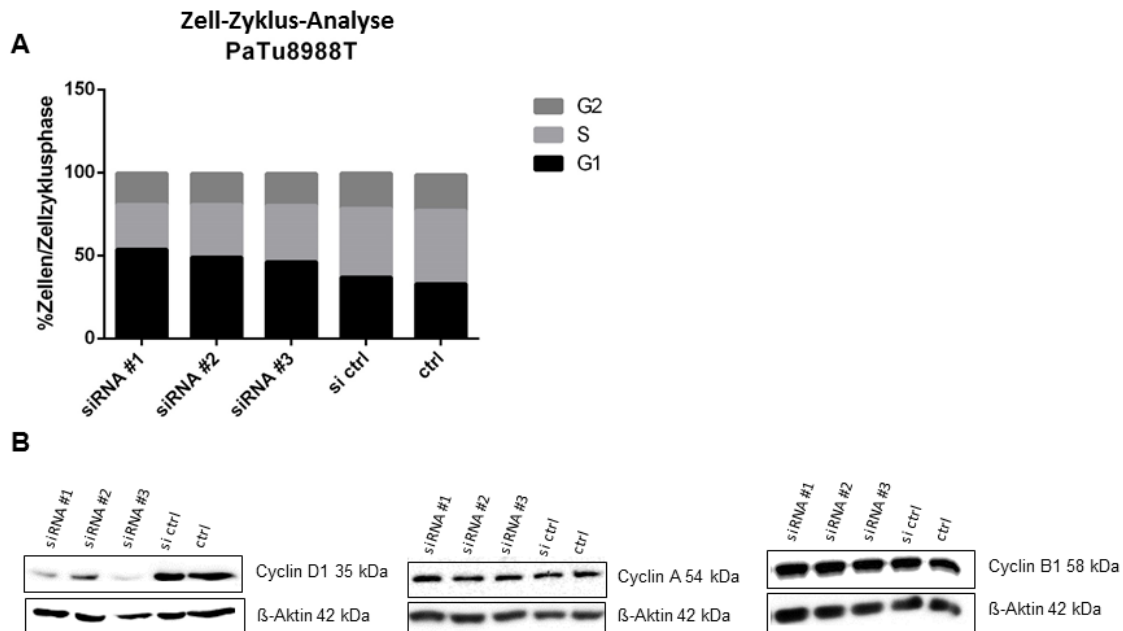


Abbildung 4-15 USP5-Knockdown beeinflusste den Zellzyklus

(A) Durchflusszytometrische Analysen zeigten, verglichen mit den Kontrollen, einen G1-Arrest in PaTu8988T Zellen ohne *USP5*. Dargestellt wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen 48 Stunden nach der Transfektion. (B) Validierung der durchflusszytometrischen Daten im Westernblot. Detektion von Cyclin D1, Cyclin A und Cyclin B1 nach 24 Stunden. Alle Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. si ctrl= transfiziert mit non-Silencing Kontrolle, ctrl = unbehandelt.

4.4.3. DNA-Brüche führen zur Aktivierung von *p21/CDKN1A* und Apoptose

Im Anschluss wurden PaTu8988T- und Panc-1-Zellen mit transientem *USP5*-Knockdown auf Apoptosesignale untersucht. Nach der Einleitung der Apoptose in der Zelle kommt es zur spezifischen Spaltung von PARP und Caspase-3. Diese Apoptosemarker wurden, 48 Stunden nach dem *USP5* Knockdown, im Westernblot untersucht. Die Detektion erhöhter Level an Spaltprodukten von Caspase-3 und PARP lieferten hierbei Indizien für eine zusätzliche Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade (Abbildung 4-16).

Wegen des bereits beschriebenen Einflusses von *USP5* auf die DNA-Reparaturmechanismen wurde untersucht, ob die Apoptose durch Doppelstrangbrüche ausgelöst wurde. Im Westernblot konnte bereits 48 Stunden nach der Transfektion der siRNAs ein deutlicher Anstieg des pH2AX-Level, in den Zellen ohne *USP5* im Vergleich zu der siRNA Kontrolle und den unbehandelten Zellen, gezeigt werden (Abbildung 5-16). Zusätzlich wurde, in den Tumor-Zelllinien PaTu8988T und Panc-1, die Regulation von *p21/CDKN1A*, einem Regulator für die Interaktion von BER-Faktoren mit PARP während

der DNA Reparatur, untersucht. 24 Stunden nach dem *USP5 Knockdown* konnte im Westernblot ein Anstieg von *p21/CDKN1A* in den Zellen gezeigt werden (Abbildung 4-16).

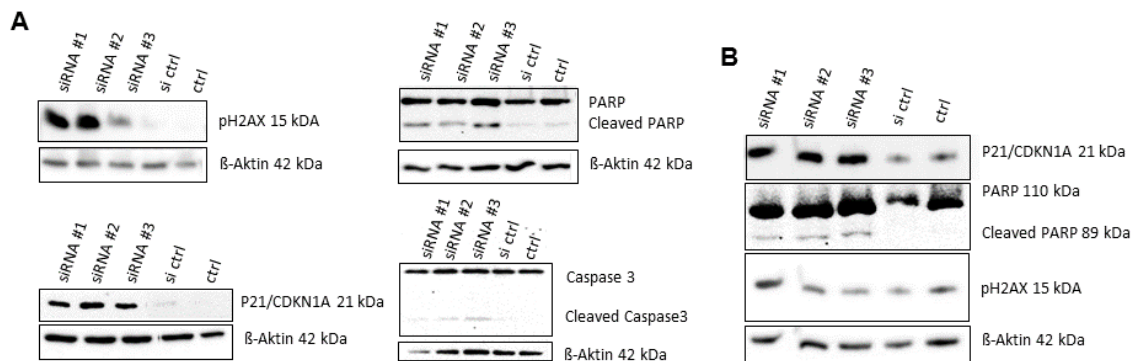


Abbildung 4-16 *USP5-Knockdown* induzierte Apoptose durch Doppelstrangbrüche

(A-B) Westernblot auf pH2AX, PARP, *cleaved*-PARP und /oder Caspase3 und *cleaved*-Caspase3 nach 48 Stunden in (A) PaTu8988T und nach 72 Stunden in (B) Panc-1 Zellen. *p21/CDKN1A* wurde nach 24 Stunden im Westernblot detektiert. Alle Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Ergebnissen bestätigt. si ctrl= transfiziert mit non-*Silencing* Kontrolle, ctrl = unbehandelt.

4.4.4. *USP5* reguliert über eine *p27/CDKN1B* Modifikation die Ubiquitinierung und den Proteinabbau

USP5 spielt, wie bereits beschrieben, eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Ubiquitinen, weshalb der Einfluss von *USP5* auf die Ubiquitinierung von Proteinen untersucht wurde. Ebenso ist bereits bekannt, dass *USP5* den TP53-Signalweg in Kolonkarzinomzellen reguliert. Wie in der Einleitung bereits beschrieben wurde, liegt in fast 50 % der Pankreaskarzinome *TP53* in einer mutierten Form vor, weshalb der TP53-Signalweg in den verwendeten Pankreaskarzinomzellen nicht mehr aktiv ist und somit keine Regulierung mehr stattfindet.

48 Stunden nach dem *Knockdown* von *USP5* wurden Zelllysate im Westernblot auf Gesamt- Ubiquitin gefärbt. Dabei zeigte sich, dass in der Abwesenheit von *USP5*, mehr freie Ubiquitine in der Zellen der Zelle vorhanden waren als in den Kontrollen (Abbildung 4-17).

Interessanterweise waren nach *USP5 Knockdown* nicht nur die Proteinspiegel des Zellzyklusregulators *p21/CDKN1A* erhöht, sondern es zeigte sich darüber hinaus eine spezifische Heraufregulation eines weiteren bekannten Regulatorproteins der Zellzykluproggression, *p27/CDKN1B*. Wie in Abbildung 4-17 dargestellt wurde, zeigten die Westernblots 48 Stunden nach dem *Knockdown* von *USP5* keine Regulation von TP53 in den Tumorzelllinien PaTu-8988T und Panc-1, jedoch, verglichen mit den

Kontrollen, ein erhöhtes Proteinlevel von p27/CDKN1B in den spezifischen *USP5*-reprimierten Zellen.

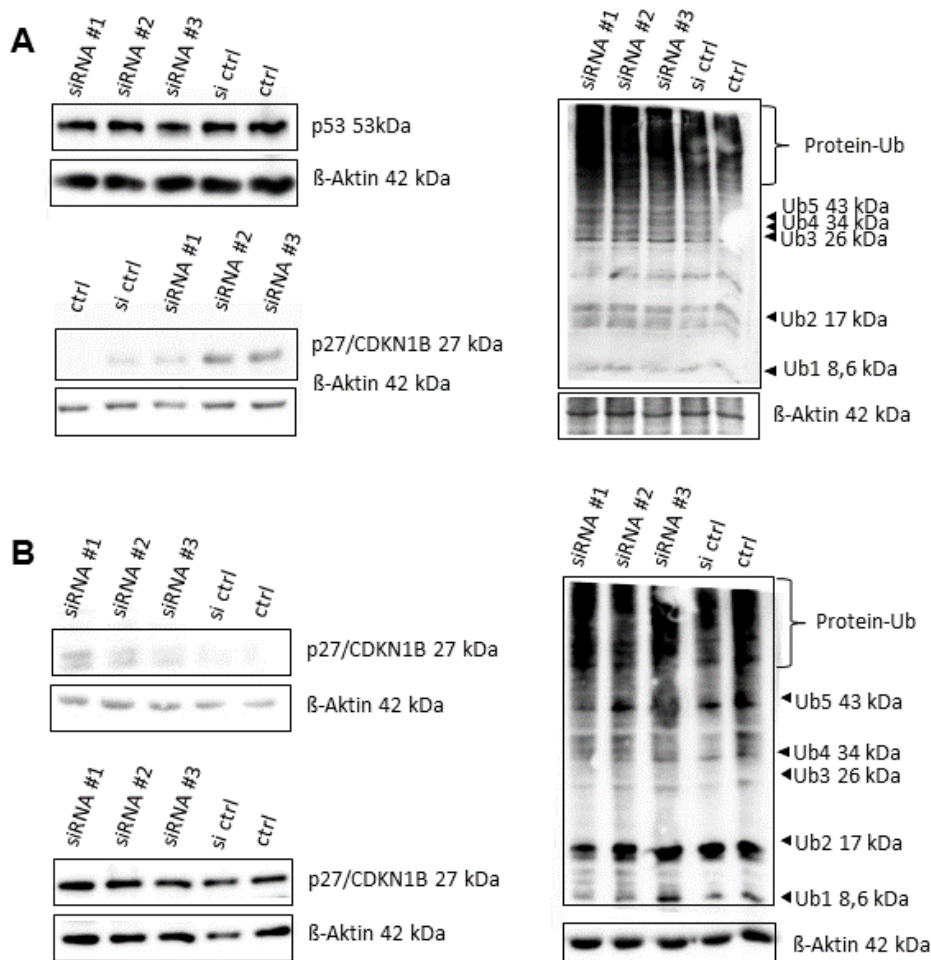


Abbildung 4-17 *USP5*-Knockdown beeinflusste die Ubiquitinierung und führt zur Akkumulation p27/CDKN1B in den Zellen.

(A-B) Westernblot auf TP53, p27/CDKN1B und Ubiquitin 72 Stunden nach *USP5*-Knockdown in (A) PaTu8988T und (B) Panc-1-Zellen. Die Ergebnisse wurden dreimal unabhängig voneinander bestätigt. Ub = Ubiquitin. si ctrl= transfiziert mit non-Silencing Kontrolle, ctrl = unbehandelt

Um zu überprüfen, ob die Regulation von *p27/CDKN1B* primär auf Protein- oder auf mRNA-Ebene stattfindet, wurden zunächst qRT-PCR-Analysen durchgeführt und 72 Stunden nach *USP5* Knockdown die mRNA-Level von *p27/CDKN1B* bestimmt. Die Daten in Abbildung 4-18 A zeigen, dass sich das mRNA-Level der transfizierten Zellen nicht signifikant von den Kontrollen unterscheidet.

Im Anschluss wurden PaTu8988T Zellen mit und ohne *USP5* mit Cycloheximid behandelt. Diese Substanz inhibiert den Proteinsyntheseapparat vollständig, wodurch keine neuen Proteine der Zelle bereitgestellt werden können. Dafür wurden *USP5*-reprimierte PaTu8988T-Zellen und Kontroll-Zellen mit 20 μ M Cycloheximid behandelt. Die Kontrollzellen wurden vor der Cycloheximid-Zugabe 6 Stunden mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt, um eine Protein-Stabilisierung durch

unspezifische Proteasom-Inhibition zu initiieren. Es zeigte sich, dass nach der Behandlung mit MG132, das wie erwartet, das Level von p27/CDKN1B in den behandelten Zellen, verglichen mit den unbehandelten Zellen, anstieg. Dieser Effekt hielt, trotz Inhibition der Protein-Neusynthese, über mindestens 4 Stunden an. Im Vergleich dazu war in den *USP5* reprimierten Zellen zum Zeitpunkt 0 ein deutliches Signal von p27/CDKN1B und ein zusätzliches Signal von p27/CDKN1B mit einem erhöhten Molekulargewicht zu sehen, was auf das Vorliegen einer posttranslational modifizierten Isoform von p27/CDKN1B hindeutete. Diese modifizierte Isoform blieb in Anwesenheit von Cycloheximid über 3 Stunden stabil, wurde dann jedoch abgebaut. Es ist allerdings anzumerken, dass ein ähnlicher Effekt auch in den DMSO-behandelten Kontrollen (Abbildung 4-18, linkes panel) beobachtet wurde. Es ist daher unklar, ob der p27-Abbau nach 4 Stunden tatsächlich die zeitliche Dynamik der p27-Stabilisierung in Abwesenheit von *USP5* widerspiegelt oder ein Artefakt der Behandlung mit DMSO als Lösemittel darstellt.

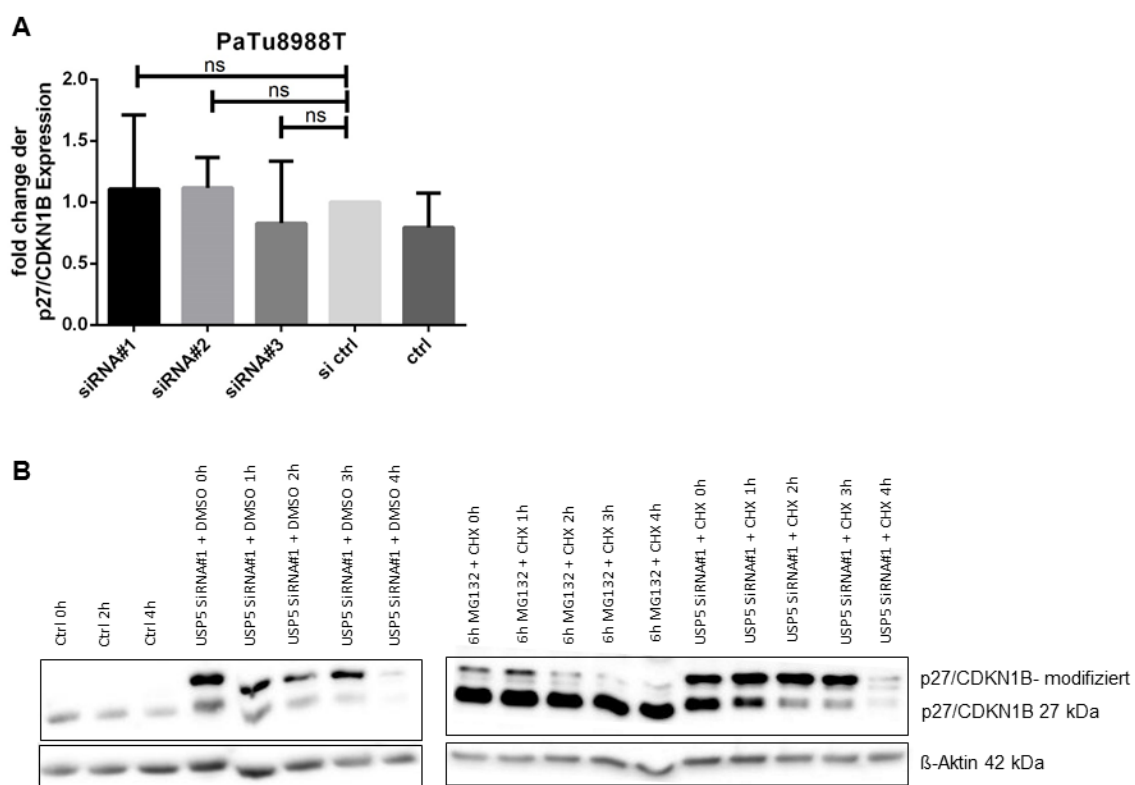


Abbildung 4-18 Die Abwesenheit von *USP5* stabilisierte eine modifizierte Form von p27/CDKN1B

(A) qRT-PCR-basierte Analyse der Expressionslevel von *p27/CDKN1B* 24 Stunden nach dem *Knockdown* von *USP5*. Dargestellt ist der *fold change* der *p27/CDKN1B*-Expression in PaTu8988T-Zellen, mit und ohne *USP5*-Expression. (B) Stabilisierung des modifizierten p27/CDKN1B über 3 Stunden nach Zugabe von 20 µg/ml Cycloheximid in PaTu8988T-Zellen. Als Kontrolle wurden PaTu8988T-Zellen 6 Stunden mit 30 µM MG132 behandelt und anschließend mit 20 µg/ml Cycloheximid oder nach Transfektion mit *USP5*-siRNA über den gleichen Zeitraum mit DMSO. Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. si ctrl= transfiziert mit non-*Silencing* Kontrolle, ctrl = unbehandelt ns = nicht signifikant (Student's *t*-Test).

Um den funktionellen Zusammenhang zwischen *USP5* und *p27/CDKN1B* zu bestätigen, wurden anschließend erste *Rescue*-Experimente durchgeführt. In PaTu8988T Zellen wurde gleichzeitig *p27/CDKN1B* und *USP5* reprimiert. Es wurden zwei verschiedene spezifische siRNAs gegen *p27/CDKN1B* verwendet, die jeweils zusammen mit *USP5* siRNA #2 oder zusammen mit Kontroll-siRNA (si ctrl) transfiziert wurden, um gleiche Gesamtkonzentrationen von siRNA zu gewährleisten. Ebenso wurde *USP5* siRNA#2 zusammen mit si ctrl transfiziert, um auch hier die gleiche Gesamtkonzentration von siRNA zu erhalten. In Abbildung 4-19 werden die Ergebnisse von MTT-Assays in PaTu8988T-Zellen 72 Stunden nach dem *Knockdown* von *USP5* und *p27/CDKN1B* dargestellt. Nach der Transfektion von *USP5* siRNA#2 + si ctrl war zwar ein signifikanter Rückgang an vitalen Zellen messbar, der jedoch deutlich geringer ausfiel als der zuvor mit reiner *USP5* siRNA beobachtete Effekt (s. Abbildung 4-12 C). Zusätzlich wurde durch *p27/CDKN1B*-siRNA #1 bereits eine geringe Abnahme an vitalen Zellen festgestellt, was am ehesten als off-target-Effekt zu werten war, da der Funktionsverlust von p27 zu keiner Verringerung der Vitalität führen sollte. Dagegen wurden die Tumorzellen durch den *Knockdown* von *p27/CDKN1B*-siRNA #2 nicht beeinflusst, und der Doppel-*Knockdown* von *p27/CDKN1B*-siRNA #2 und *USP5*-siRNA zeigte einen Anstieg der Anzahl an vitalen PaTu8988t-Zellen im Vergleich zu dem *Knockdown* von *USP5*.

Um die Effektivität der siRNAs zu messen, wurde das Expressionslevel von *p27/CDKN1B* und *USP5* im *Rescue*-Experiment mittels qRT-PCR bestimmt (Abbildung 4-19).

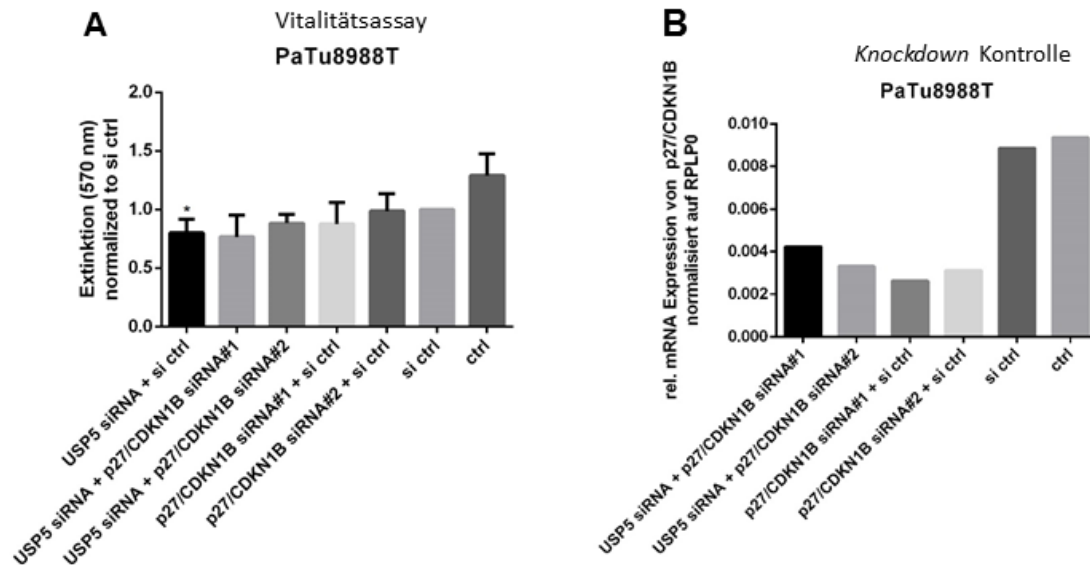


Abbildung 4-19 Die Reduktion der vitalen Zellen nach dem *Knockdown* von *USP5* konnte durch die Repression von *p27/CDKN1B* aufgehoben werden

(A) MTT-Assay von PaTu8988T-Zellen nach *Knockdown* mit USP5-siRNA #2 und p27/CDKN1B-siRNA #1 und siRNA #2. Durch p27/CDKN1B-siRNA #1 war ein *off-Target*-Effekt durch eine Regulation in der Vitalität der Tumorzelllinie erkennbar. USP5-siRNA #2 zeigte eine signifikante Abnahme an vitalen Zellen. Nach dem Doppel-*Knockdown* mit p27/CDKN1B-siRNA#2 und USP5-siRNA #2 wurde der Effekt der USP5-siRNA #2 wieder aufgehoben. (B) Mittels qRT-PCR wurde das relative Expressionslevel von *p27/CDKN1B* 24 Stunden nach dem *Knockdown* mittels spezifischer siRNA ermittelt. si ctrl= transfiziert mit non-Silencing Kontrolle, ctrl = unbehandelt. *p<0,05, (Student's T-Test).

4.4.5. *USP5-Knockdown* reduzierte das Tumorwachstum *in vivo*

In vitro konnte ein regulatorischer Effekt für *USP5* auf die Proliferation, Vitalität und das substratunabhängige Wachstum in pankreatischen Tumorzellen, durch RNA-Interferenz Experimente, gezeigt werden. Deshalb wurde für die nachfolgenden *in vivo* Analysen ein Tetracyclin-induzierbares shRNA-Konstrukt im pLKO-Vektor hergestellt. Mit Hilfe einer lentiviralen Transduktion und anschließender Selektion wurde das Konstrukt in das Genom von PaTu8988T-Zellen integriert, um eine stabile induzierbare Expression der shRNA über einen langen Zeitraum zu ermöglichen. Um die Induzierbarkeit des Zellklons nachzuweisen, wurde dieser im MTT-Assay getestet, bevor er für die *in vivo* Studie in Mäuse transplantiert wurde. Dafür wurden die stabil transduzierten Zellen 5 Tage mit und ohne 2 mg/ml Doxycyclin kultiviert und die Vitalität der Zellen bestimmt. Abbildung 4-20 A zeigte nach der Zugabe von Doxycyclin eine Reduktion der Zellvitalität um 80 %.

In Kooperation mit der EPO GmbH in Berlin wurden die stabil transfizierten PaTu8988T-Zellen mit Matrigel vermischt und in die Flanken von athymischen Nacktmäusen (n=12) injiziert. Die Tumorgröße wurde über einen Zeitraum von 41 Tagen gemessen. Ab dem ersten Tag nach der Injektion erfolgte bei der Hälfte der Tiere (n=6) die Zufuhr von

Doxycyclin über das Trinkwasser, wodurch die shRNA aktiviert und die Ziel-RNA in den Tumorzellen reprimiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass bereits 9 Tage nach der Injektion der Zellen ein geringeres Tumolvolumen in den Doxycyclin behandelten Tieren, gegenüber den Kontrolltieren, messbar war. Nach beenden des Versuchs konnte in der Kontrollgruppe ein durchschnittliches Tumolvolumen von 155 mm³ gemessen werden, während die 6 Tiere, die mit Doxycyclin behandelt wurden, ein durchschnittliches Tumolvolumen von 83 mm³ hatten (Abbildung 4-20 B).

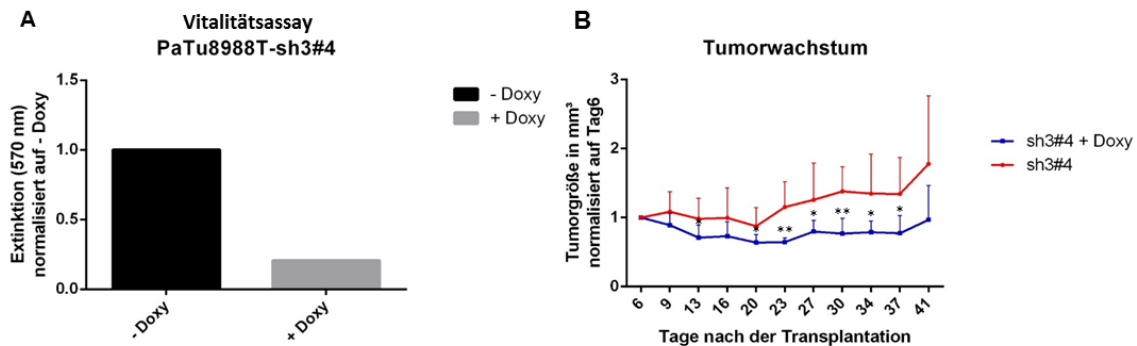


Abbildung 4-20 Stabile *USP5* Repression in PaTu8988T-Zellen führte zu einer signifikanten Wachstumshemmung im Xenograft-Mausmodell

(A) MTT-Assay des stabilen Zellklons PaTu8988T-sh3#4 nach einer 5-tägigen Behandlung, mit und ohne 2 mg/ml Doxycyclin. Dargestellt sind die Extinktion bei 570 nm aus drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die Zellen ohne Doxycyclin-Behandlung. (B) Tumorstadium in den athymischen Nacktmäusen mit und ohne Doxycyclin-Behandlung während der Versuchsdauer von 41 Tagen. Jede Gruppe bestand aus 6 Tieren. Die Tumorstadium wurde in normalisiert auf die Tumorstadium Tag6 nach der Transplantation angegeben. *p<0,05, **p<0,01 (Student's *t*-Test)

5. Diskussion

Trotz erheblicher Anstrengungen ist die Biologie des Pankreaskarzinoms immer noch nicht vollständig geklärt. Bisher gibt es kaum Substanzen die erfolgreich für die Behandlung des Karzinoms eingesetzt werden können. Neben dem Standardmedikament Gemcitabine, das seit 1997 zur Behandlung von Pankreaskarzinomen zum Einsatz kommt (Michl and Gress, 2013) gibt es noch weitere zytotoxische Substanzen, wie beispielsweise 5-FU (Berlin et al., 2002), Capecitabine (Herrmann et al., 2007), Oxaliplatin (Poplin et al., 2009), Irinotecan (Rocha Lima et al., 2004) oder Pemetrexed (Oettle et al., 2005), die in Kombination mit Gemcitabine eingesetzt werden. Trotz einer kleinen Verbesserung in einzelnen Fällen, konnte mit keiner der Therapien die durchschnittliche Überlebenszeit signifikant verlängert werden (Michl and Gress, 2013). Daher ist es dringend notwendig, neue Zielgene für neue therapeutische Ansätze zu identifizieren. Proteine mit enzymatischer Funktion bieten gute Voraussetzung für eine pharmakologische Hemmung mit kleinen Molekülen. Aus dem shRNA-Screen, der dieser Arbeit vorausgegangen war, konnten *SMC2* und *USP5* als potentielle neue therapeutische Zielgene identifiziert werden.

5.1. *SMC2* und die Rolle im Pankreaskarzinom

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass *SMC2* im Pankreaskarzinom im Vergleich zur chronischen Pankreatitis oder gesunden Pankreasgewebe signifikant überexprimiert ist. Bereits frühere Studien zeigten, dass genetische Veränderungen im Condensin Komplex, eine Rolle in der Genomstabilität in Pyothorax assoziierten Lymphomen (PAL) spielt (Ham et al., 2007). Ungeachtet dessen, ist eine Funktion der *SMC2*-Überexpression im Pankreaskarzinom, bisher noch nicht beschrieben.

5.1.1. Die Aufklärung der Rolle von *SMC2* im Pankreaskarzinom

SMC2 ist Teil beider Condensin-Komplexe im Menschen und übernimmt in gesunden Zellen die Reparatur von DNA-Strangbrüchen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein, durch RNA-Interferenz induzierter *Knockdown* von *SMC2*, die Proliferation, die Vitalität und das substratunabhängige Wachstum, gemessen im BrdU-, MTT- und Soft-Agar-Assay, in 4 verschiedenen pankreatischen Tumorzelllinien reduziert. Die Daten

weisen darauf hin, dass sowohl die verringerte Proliferationsrate der Zellen im BrdU-Assay, als auch die geringere Anzahl an Kolonien und deren Größe im Soft-Agar-Assay, nicht durch eine Zellzyklushemmung, sondern durch eine Reduktion der Anzahl vitaler Zellen verursacht wird. Durch die Repression von *SMC2* war zwar in durchflusszytometrischen Analysen des Zellzykluses ein leichter Anstieg der Zellen in der G1-Phase messbar, diese Regulation konnte jedoch in Westernblot-Analysen von zellzyklusregulatorischer Proteine nicht bestätigt werden. Stattdessen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass apoptotische Signalkaskaden aktiviert wurden, diese führten dazu, dass der Knockdown von *SMC2*, im Gegensatz zu den Kontrollen im BrdU-Assay eine geringe Proliferationsrate zeigte.

In nicht-transformierten, aber immortalisierten Zellen (HEK293), ist der Einfluss von *SMC2* wesentlich geringer als in Tumorzelllinien des Pankreas. Interessanterweise zeigte Fazzio und Panning bereits *in vivo*, dass der Knockdown von *SMC2* in embryonalen Stammzellen in der Maus den Zelltod auslöst, nicht aber in immortalisierten embryonalen Mausfibroblasten (Fazzio and Panning, 2010). Die Auswirkung der *SMC2* Inhibition scheint daher stark vom zellulären Kontext abhängig zu sein. Obwohl die Analyse einer einzelnen nicht-transformierten Zelllinie keine generellen Rückschlüsse zulässt, könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass transformierte Zellen besonders empfindlich gegen eine *SMC2* Inhibition sind.

5.1.2. Aufklärung der mechanistischen Hintergründe des *SMC2* Knockdowns

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den *Knockdown* von *SMC2* die zelluläre Antwort auf DNA Schäden (*DNA damage response*, DDR) aktiviert wird. Durch das Ansteigen des γ H2AX- Level, einem Indikator für Doppelstrangbrüche, in den *SMC2*-reprimierten Zellen, werden apoptotische Signalwege in der Zelle ausgelöst. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass ein ausreichender Spiegel an *SMC2*-Protein, auf Grund seiner integralen Rolle in beiden Condensin-Komplexen, für das Bereitstellen von DNA-Reparaturproteinen und somit für eine effiziente *DNA damage response* notwendig ist (Heale et al., 2006, Kong et al., 2011, Wood et al., 2008). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Condensin I durch die Interaktion mit PARP1 an schadhaften Stellen auf der DNA stabilisiert wird (Heale et al., 2006), während Condensin II mit dem DDR-Protein MCPH1 interagiert und somit Schäden durch homologe Rekombinationen korrigiert (Wood et al., 2008). Ein einziger, nicht reparierter zellulärer Doppelstrangbruch, ist unter Umständen ausreichend um den Zelltod

auszulösen (Slupphaug et al., 2003). Anhand der in dieser Arbeit gezeigten Daten, kann man spekulieren, dass die Anhäufung von DNA Schäden, die aufgrund des fehlenden SMC2 wahrscheinlich nicht vollständig repariert werden konnten, für das Auslösen des Zelltods in den Pankreaskarzinomzelllinien nach SMC2 *Knockdown* verantwortlich war.

Davalos et al. (2012) demonstrierte, dass β -Catenin den Promotor von SMC2 in Dickdarmtumoren reguliert, und SMC2-Expression somit durch den WNT-Signalweg gesteuert wird. Es ist bereits bekannt, dass der WNT-Signalweg in der Entwicklung des Pankreas eine wichtige Rolle spielt. Auch in der Karzinogenese ist die Aktivität des WNT-Signalweges erhöht (Wang et al., 2014a); beispielsweise korreliert die Intensität der WNT5A Expression mit dem Differenzierungsgrad des Tumors. Es wurde auch beschrieben, dass WNT bei der Invasivität und Metastasierung eine wichtige Rolle spielt (Weeraratna et al., 2002). Zusätzlich konnte Griesmann et al. (2013) zeigen, dass speziell WNT5A einen starken überlebensfördernden Effekt im Pankreaskarzinom hat, der mit der Hochregulation von NFATc2 assoziiert ist. Auf diesen Publikationen basierend wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen SMC2 und WNT5A im Pankreaskarzinom untersucht, wodurch SMC2 als zusätzlichen Mediator des WNT5A-Signalweges identifizieren werden konnte.

In WNT5A reprimierten PaTu8988T-Zellen war die Expression von SMC2 reduziert und die Proteinlevel von zellulärem p21/CDKN1A und pH2AX stiegen an. Aus den in dieser Arbeit ermittelten Daten kann man die Hypothese aufstellen, dass eine erhöhte Expression von SMC2 für die WNT-gesteuerte Proliferation des Pankreaskarzinoms notwendig ist. Durch das Einbeziehen der vorausgehenden Studie von Davalos et al. (2012) und den in dieser Arbeit gewonnen Daten, kann man vermuten, dass im Pankreaskarzinom die Regulation von SMC2 durch WNT5A durch einen Feedback-Loop gesteuert wird. Diese These muss jedoch erst noch mit weiteren Versuchen bestätigt werden.

Die *in vivo* Versuche mit und ohne SMC2 zeigten, trotz des signifikanten *Knockdowns* von SMC2 im Gewebe, keine deutliche Reduktion des Tumorwachstums in den Tieren. Jedoch ist die Tendenz eines verlangsamten Tumorwachstums zu sehen. Davalos et al. (2012) zeigte, dass nach transienten *Knockdown* von SMC2 in DLD-1-Zellen, das Tumorwachstum in athymischen Nacktmäusen über einen Zeitraum von 5 Wochen stark reduziert war.

Im Gegensatz zu den von Davalos et al. (2012) beobachteten Wachstumsraten zeigten die in dieser Arbeit verwendeten Patu8988T-Zellen, im Xenograft Mausmodell, ein deutliche langsames Wachstum, was einen vergleichsweise langen Beobachtungszeitraum von 69 Tagen erforderte, um selbst in unbehandelten

Kontrollzellen ein signifikantes Tumorwachstum sichtbar machen zu können. Eine mögliche Erklärung für die geringe beobachtete Effektgröße könnte daher in der Tatsache zu suchen sein, dass der langsame Wachstumsverlauf die Aktivierung kompensatorischer Effekte in *SMC2*-reprimierten Zellen ermöglicht, weshalb dann, trotz nach wie vor nachweisbarem *Knockdown*, keine signifikanten Unterschiede im Wachstum gemessen werden konnten.

5.2. *USP5* und die Rolle im Pankreaskarzinom

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch *USP5* in Tumoren des Pankreas deutlich überexprimiert ist, verglichen mit gesunden Geweben. 2014 beschrieben Ova et al. dass Zellen, die durch das Epstein-Barr-Virus transformiert wurden (LDL-Raji Zellen), eine erhöhte Aktivität von *USP5* zeigen (Ova et al., 2004). Bisher gibt es noch keine Studie, die die Überexpression von *USP5* im Pankreaskarzinom beschreibt.

5.2.1. Die Aufklärung der Rolle von *USP5* im Pankreaskarzinom

Die Aufgabe von *USP5* ist hauptsächlich die Bereitstellung von freien Ubiquitinen für die Ubiquitinierung von abzubauenen Proteinen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch den *Knockdown* von *USP5* die Proliferation in den vier verwendeten pankreatischen Tumorzelllinien reduziert wurde. Im Gegensatz dazu waren nicht-transformierten Zellen (HEK293) wesentlich weniger beeinflusst.

Die Daten zeigen, dass in den Tumorzellen durch den *Knockdown* von *USP5*, ein Arrest der Zellen am G1/S-Phasen-Übergang ausgelöst wurde. Für die Abnahme der Anzahl an vitalen Zellen nach *USP5-Knockdown* war jedoch die Hemmung des Zellzyklus nicht allein verantwortlich. Auch die Induktion der Apoptose verringerte die Anzahl der vitalen Zellen im Assay.

Beide Mechanismen sind zusätzlich dafür verantwortlich, dass eine Reduktion der Koloniezahl und der Koloniegröße im Soft-Agar-Assay auftrat. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten aus dem malignen Melanom überein. Dort konnte durch Potu et al. (2014) gezeigt werden, dass der *Knockdown* von *USP5* sowohl das Zellwachstum, als auch die Koloniebildung im Matrigel in *BRAF*-negativen Zellen reduziert.

Nicht nur *in vitro*, war in dieser Arbeit, eine signifikante Reduktion der Proliferation und des substratunabhängigen Wachstums nach dem *Knockdown* von *USP5* in Zelllinien des Pankreastumors zu beobachten, auch die *in vivo* Daten zeigten ein deutlich reduziertes Tumorwachstum in den Mäusen.

5.2.2. Aufklärung der mechanistischen Hintergründe des *USP5* *Knockdowns*

Aus den Ergebnissen kann man entnehmen, dass *USP5* den Zellzyklus durch einen G1-Arrest reguliert und dadurch verhindert, dass die Zellen in die S-Phase eintreten. Diese Wachstumsinhibition ist mit einer Herunterregulation von Cyclin D1 assoziiert. Zusätzlich bewirkt der *Knockdown* von *USP5* einen Anstieg von endogenem *pH2AX* und *p21/CDKN1A* in den Zellen und die Aktivierung von apoptotischen Signalwegen, die anhand der Spaltung von Caspase-3 und PARP initiiert, nachweisbar ist. In HeLa- und HTC116-Zellen wurde beschrieben, dass *USP5* für eine effiziente Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels homologe Rekombination notwendig ist (Nakajima et al., 2014). Durch RAD18 wird *USP5* an Doppelstrangbrüche (DSB) rekrutiert um die Polyubiquitin-Ketten an den DNA-Schäden zu entfernen, damit dann die beschädigte Stelle repariert werden kann (Nakajima et al., 2014). Die in dieser Arbeit gewonnen und die bereits publizierten Daten legen nahe, dass durch die Anhäufung von DSB in der Zelle der Zellzyklus gestoppt wird, um die entstandenen Schäden zu reparieren. Durch eine nicht effiziente Reparatur werden apoptotische Signalwege aktiviert, die zum Tod der Zelle führen.

Vorausgehende Arbeiten, aus der Arbeitsgruppe von Saville, konnten bereits zeigen, dass *USP5* in TP53-Wildtyp-Kolonkarzinomzellen den TP53-Signalweg reguliert. Darin wurde beschrieben, dass der *Knockdown* von *USP5* den proteasomalen Abbau von TP53 verzögert, wodurch TP53 stabilisiert und dessen transkriptionelle Aktivität im Zellkern erhöht wird. *USP5* regulierte in diesem Kontext den proteasomalen Abbau von TP53 ohne einen Abbau von MDM2 zu beeinflussen (Dayal et al., 2009). Der unterschiedliche Effekt des *USP5-Knockdowns* auf TP53 und MDM2 ermöglicht einen Mechanismus für die TP53-Aktivierung, die nicht durch MDM2 reprimiert werden kann (Saville et al., 2004, Stommel and Wahl, 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien des Pankreas tragen jedoch Mutationen im *TP53-Gen* (Butz et al., 2003, Schumacher et al., 1999). Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass *USP5* seine Effekte in Pankreaskarzinomzellen über eine Beeinflussung des TP53-Signalwegs

vermittelt. Folgerichtig zeigten Westernblot-Analysen keine Hinweise auf veränderte TP53-Proteinspiegel in *USP5-Knockdown*- und Kontrollzellen.

Trotzdem tritt nach der Reduktion von *USP5* eine erhöhte Menge an freiem Ubiquitinen in den Zellen auf. Es wurde bereits gezeigt, dass freie, ungebundene Ubiquitine eine hohe Affinität an das Proteasom und an Adapter-Proteine haben. Adapter-Proteine dienen dazu ubiquitinierte Proteine zum Proteasom leiten (Deveraux et al., 1994, Hicke et al., 2005, Raasi et al., 2005). Man kann daher vermuten, dass durch den *Knockdown* von *USP5* gezielt der Abbau von bestimmten Proteinen verzögert ist, die dann in der Zelle akkumulieren. Zusätzlich häufen sich freie Polyubiquitine in der Zelle an, die wegen des fehlenden USP5 nicht mehr recycelt werden.

In den verwendeten Tumorzellen des Pankreas, konnte in dieser Arbeit die Akkumulation von p27/CDKN1B nachgewiesen werden. Da auf transkriptioneller Ebene keine Regulation stattfindet, muss das Protein vor Abbau geschützt sein. Dies geschieht möglicherweise über eine Modifikation auf translationaler Ebene. Im Westernblot konnte eine modifizierte Form von p27/CDKN1B mit Größenunterschied von etwa 5 kDa festgestellt werden. Bei diesem Größenunterschied kann es sich sowohl um eine Monoubiquitinierung, Phosphorylierung oder auch um eine Acetylierung handeln. Die genaue Spezifikation, der post-translationalen Modifikation, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig bestimmt werden. Man kann jedoch davon ausgehen, dass es sich hierbei um eine spezifische Modifikation und Akkumulation handelt, da durch die Behandlung von nicht transfizierten Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 nur eine Akkumulation des nicht modifizierten p21/CDKN1A stattfindet, womit ein unspezifisches Signal im Westernblot ausgeschlossen werden kann. Eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse wird jedoch dadurch erschwert, dass das Lösungsmittel DMSO selbst bereits einen Effekt auf das modifizierte p27/CDKN1B Protein auszuüben scheint.

Erste Daten im *Rescue*-Experiment geben Anhaltspunkte darauf, dass *USP5* *p27/CDKN1B* reguliert. Es wurde bereits beschrieben, dass in gesunden proliferierenden Zellen p27/CDKN1B phosphoryliert und anschließend nach der Markierung mit Ubiquitinen im Proteasom abgebaut wird (Montagnoli et al., 1999). Erst durch spezifische Signale, beispielsweise Kontaktinhibition, wird p27/CDKN1B stabilisiert (Yanagisawa et al., 1999); die Folge ist eine Inhibition der Zellzyklusprogression, die unter anderem über die Bindung von p27/CDKN1B an CDK2 vermittelt wird. Deshalb ist in proliferierenden unbehandelten Tumorzellen nur wenig p27/CDKN1B nachweisbar; eine Transfektion von siRNA gegen p27/CDKN1B sollte daher in diesen Zellen keinen, oder wenn dann einen zusätzlich proliferationsfördernden, Effekt ausüben. Aufgrund dieser Informationen kann man davon ausgehen, dass es sich bei der Reduktion der Anzahl vitaler PaTu8988T-Zellen, die durch p27/CDKN1B-siRNA #1 ausgelöst wurde, um ein

Off-Target-Effekt handeln muss. Der durch p27/CDKN1B-siRNA #2 ausgelöste *Knockdown* zeigte dagegen, wie erwartet, keine Veränderung im MTT- Assay verglichen mit den Kontrollen. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass die Reduktion der Vitalität, die durch den *Knockdown* von USP5 ausgelöst wurde, durch gleichzeitigen *knockdown* von p27 mit siRNA#2 ausgeglichen werden konnte. Obwohl die funktionellen Effekte auf Grund der für jede einzelne siRNA verringerten Konzentration gering ausfielen und der beobachtete *Rescue*-Effekt daher keine statistische Signifikanz erreichte, stellen diese Ergebnisse eine erste Bestätigung der Hypothese dar, dass der durch *USP5-Knockdown* verursachte wachstumshemmende Effekt in großen Teilen durch die Stabilisierung des Zellzyklusinhibitors p27/CDKN1B vermittelt wird. Diese Ergebnisse müssen nichtsdestotrotz in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Insgesamt reihen sich diese Ergebnisse in eine wachsende Anzahl von Beobachtungen ein, die eine wichtige Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps von Tumorzellen und eine Eignung dieses Systems für therapeutische Intervention belegen. Mehrere Studien, mit verschiedenen nicht selektiven Inhibitoren für deubiquitinierende Enzyme, wiesen bereits auf erste Erfolge in der Tumorthherapie (Pal et al., 2014) hin. Der für USP7 entwickelte Inhibitor HBX41,118, zeigte bereits in HEK293-Zellen eine Stabilisierung von TP53 und in der Dickdarmkarzinomzelllinie HCT-116 (TP53-Wildtyp oder *-Knockout*) kam es zur Induktion von Apoptose (Colland et al., 2009). Auch der bereits vorhandene Inhibitor WP1130, der unter anderem USP9x inhibiert, führte zur Apoptoseinduktion in Lymphoblasten aus B-Zell non Hodgkin Lymphom (Z-138) und steigerte die Sensitivität von chronischen myeloischen Leukämiezellen auf die Chemotherapie (Bartholomeusz et al., 2007, Kapuria et al., 2010). Zusätzlich wird das Wachstum von *ERG* (*erythroblast transformation- specific-related oncogene*)-positiven Prostatatumoren im Xenograft-Modell durch WB1130 gehemmt (Wang et al., 2014b).

5.3. Ausblick

Da alle potentiellen Gene, die durch das Screeningverfahren identifiziert wurden, bereits im Vorfeld auf die Möglichkeit der Entwicklung kleiner inhibitorischer Moleküle selektioniert wurden, sind im Rahmen dieser Arbeit nur prinzipiell pharmakologisch inhibierbare Enzyme auf ihre Rolle und Auswirkung im Pankreaskarzinom untersucht worden. Beide identifizierten neuen Kandidatengene, *SMC2* und *USP5*, bieten daher

potenziell neue Ansatzpunkte, um zukünftig im Kampf gegen das Pankreaskarzinom bessere, therapeutische Möglichkeiten entwickeln zu können.

Auch wenn in dieser Arbeit bereits die wachstumsfördernde Funktion der Gene *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnte, sowie bereits involvierte Signalwege identifiziert wurden, sind trotzdem noch einige Fragen offen geblieben.

So ist für *SMC2* noch nicht bewiesen, dass die Ergebnisse, die im Dickdarmkarzinom von Davalos et al. (2012) beschrieben wurden, ebenso im Pankreaskarzinom ihre Gültigkeit besitzen und *SMC2* somit über ein Feedback-Loop reguliert wird. Ebenso muss noch experimentell bestätigt werden, ob *SMC2* für die *WNT5A*-abhängige Zellproliferation erforderlich ist. Zusätzlich sind keine direkten Interaktionspartner von *SMC2* beschrieben, die genaueren Aufschluss über die beteiligten Signalkaskaden geben könnten. Eine weitere Möglichkeit an fortführenden Experimenten wäre die Herstellung von konditionellen *SMC2-Knockout*-Mäusen, an denen die biologischen Mechanismen genauer untersucht werden könnten. Zusätzlich würden weitere Kreuzungen der Tiere, mit bereits vorhandenen KPC-Tieren (Hingorani et al., 2005), einen tieferen Einblick in die Rolle während Tumorentwicklung bieten, da dieses Mausmodell die humane Pankreaskarzinogenese in vielen molekularen und histologischen Details sehr exakt widerspiegelt und somit auch eine mögliche Rolle von *SMC2* in der Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des umgebenden Stromas untersucht werden könnte.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *USP5* in *TP53*-mutierten Pankreastumorzellen nicht den *TP53*-Signalweg reguliert, da dieser inaktiv ist, sondern *p27/CDKN1B* über eine, bisher noch nicht genauer definierte post-translationale Modifikation. Jedoch konnte nicht abschließend geklärt werden, um welche Art von Modifikation es sich handelt und ob dieses modifizierte *p27/CDKN1B*-Protein direkt durch die Abwesenheit von *USP5* stabilisiert wird. Nach einer genauen Analyse der molekularen Dignität des akkumulierten *p27/CDKN1B* wäre weiter aufzuklären, welchen Einfluss dieses Protein auf die Zelle hat und welche Signalwege dadurch weiter beeinflusst werden. Des Weiteren ist zu klären, ob der *Knockdown* von *USP5* in *TP53*-Wildtyp-Pankreaskarzinomzellen, wie beispielsweise Capan-2 oder PaCa3 (Deer et al., 2010, Moore et al., 2001, Zheng et al., 2012), ebenfalls *p27/CDKN1B* stabilisiert, oder ob wie im Dickdarmkarzinom *TP53* stabilisiert wird. Es besteht auch die Möglichkeit, dass, wie im malignen Melanom, zusätzlich *Fas* aktiviert wird und über den *BRAF*-Signalweg Apoptose induziert wird (Dayal et al., 2009, Potu et al., 2014).

Der generalisierte knockout von *USP5* ist embryonal letal (Overbeek, 2011). Um die Funktionen von *USP5* *in vivo* genauer untersuchen zu können, wäre daher auch hier die

Erzeugung von konditionalen *Knockout*-Modellen, die mit den bereits vorhandenen KPC-Pankreaskarzinommodellen kombiniert werden könnten, wünschenswert. Wie oben bereits für SMC2 beschrieben, könnten hierbei auch mögliche Rollen von USP5 in der Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des umgebenden entzündlichen Stromas untersucht werden.

Schlussfolgernd kann man anhand der bisher zusammengetragenen Ergebnisse spekulieren, dass die Entwicklung von Inhibitoren, sowohl gegen SMC2 als auch USP5, möglicherweise die Basis neuer Therapieansätze bieten könnten. Da beide Proteine über ihre Rollen in der DNA-Reparatur spezifisch in Tumorzellen wichtige Rollen in der Aufrechterhaltung des proliferativen Phänotyps zu spielen scheinen, erscheint insbesondere die Kombination mit einer Radiotherapie oder die Kombination mit anderen Substanzen, die die Genomintegrität beeinflussen (z.B. Taxole, alkylierende Agenzien) als vielversprechender Ansatz. Wie bereits erwähnt, bedürfen diese Hypothesen jedoch zunächst weitergehender Bestätigung in relevanten präklinischen Modellen des Pankreaskarzinoms.

6. Zusammenfassung

6.1. Deutsch

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist eine der tödlichsten und am schwersten behandelbaren Krebserkrankungen in der westlichen Welt. Durch die begrenzten diagnostischen Möglichkeiten und die wenigen wirksamen Medikamente, ist die Behandlung nur in seltenen Fällen erfolgreich.

Ein shRNA-Screen wurde durchgeführt, um neue Kandidatengene mit einer hohen biologischen Relevanz im duktales Adenokarzinom des Pankreas zu identifizieren. Die ermittelten Gene wurden auf eine einfache Therapierbarkeit mit kleinen, inhibitorischen Molekülen selektioniert. Die bisher, in Bezug auf Tumorentwicklung und Tumorverlauf unbekannten Proteine USP5 und SMC2, konnten als neue Kandidatengene identifiziert und im Rahmen dieser Arbeit, genauer auf ihre Funktionen im Pankreaskarzinom untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurde die Expression der Gene in primären Geweben und verschiedenen Tumorzelllinien mittels qRT-PCR quantifiziert. Nach transientem *Knockdown* mit unabhängigen siRNAs, wurden funktionelle Untersuchungen auf die Zellviabilität, Migrationsverhalten der Zellen und Proliferation durchgeführt. Ebenso wurden zelluläre Vorgänge, wie der Zellzyklus genauer betrachtet. Um die involvierten Signalkaskaden individuell aufzuklären wurden verschiedene Westernblots durchgeführt. Lentiviral stabil transduzierte shRNA-Klone wurde generiert, um *in vivo* Daten im Xenograft Mausmodell zu erheben.

Beide Gene zeigten eine signifikante Überexpression in humanen PDAC Geweben. Der *Knockdown* führte in beiden Fällen zu einer Reduktion der Viabilität und Proliferation sowie zur Induktion der Apoptose. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *SMC2* ein weiterer Modulator des WNT-Signalweges ist und durch *WNT5A* reguliert wird. *USP5* hingegen, reguliert die Ubiquitinierung und führt zur Stabilisation von p27/CDKN1B in *TP53* mutierten Pankreaskarzinomzellen.

Auf der Basis bereits veröffentlichten Studien und den hier ermittelten Daten kann man schlussfolgern, dass die neuen Zielgene *SMC2* und *USP5* wichtige Rollen im Wachstum und Überleben von Pankreaskarzinomzellen spielen. Beide Gene bieten optimale

Bedingungen für die Entwicklung neuer Therapieansätze durch kleine, inhibitorische Moleküle im Kampf gegen den Tumor.

6.2. Englisch

Pancreatic ductal adenocarcinoma is one of the deadliest and most difficult to treat cancer diseases in the western world. Due to the restricted diagnostic possibilities and few effective drugs, the treatment is only in rare cases successful. Therefore it is important to identify novel target genes for therapeutic and diagnostic approaches.

A shRNA-screen was performed to identify new candidate genes with high biological relevance in ductal adenocarcinoma of the pancreas. The herein established candidates were selected with regard to the potential susceptibility to treatment with small inhibitory molecules. *SMC2* and *USP5* could be identified as potential novel target genes in pancreatic cancer. So far, there are no reports concerning an influence of these genes on the development and progression of pancreatic cancer in the literature. In this study, both genes were analyzed for their function and involved pathways in pancreatic cancer.

For the characterization of the genes, gene expression was quantified using qRT-PCR in primary tissues and different tumor cell lines. After transient knockdown with independent siRNAs for each gene, functional assays were performed for viability, cell proliferation and migration. Additionally, cell cycle analyses were performed to elucidate involved cellular pathways. To identify the involved pathways individually for both genes, western blot analyses were performed. Furthermore, lentivirally transduced, stable shRNA-clones were generated to collect in vivo data in xenograft mouse models.

Both genes are significantly overexpressed in human pancreatic cancer tissues. The induced knockdown in both cases led to a reduction in viability and proliferation and induced apoptotic cascades. This study identified *SMC2* as a new modulator of the WNT-signaling pathway and as being regulated by *WNT5A*. By contrast, *USP5* is involved in ubiquitination and stabilizes p27/CDKN1B in *TP53* mutated pancreatic cancer cells.

Based on previous studies and the herein elaborated data, it can be concluded that the novel target genes *SMC2* and *USP5* play important roles in growth and survival of pancreatic cancer cells. Both genes provide ideal conditions for the development of therapeutic approaches with small inhibitory molecules to fight cancer.

7. Literaturverzeichnis

- ANDERSON, D. E., LOSADA, A., ERICKSON, H. P. & HIRANO, T. 2002. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol*, 156, 419-24.
- APTE, M. V., PARK, S., PHILLIPS, P. A., SANTUCCI, N., GOLDSTEIN, D., KUMAR, R. K., RAMM, G. A., BUCHLER, M., FRIESS, H., MCCARROLL, J. A., KEOGH, G., MERRETT, N., PIROLA, R. & WILSON, J. S. 2004. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*, 29, 179-87.
- ARDITO, C. M., GRUNER, B. M., TAKEUCHI, K. K., LUBESIEDER-MARTELLATO, C., TEICHMANN, N., MAZUR, P. K., DELGIORNO, K. E., CARPENTER, E. S., HALBROOK, C. J., HALL, J. C., PAL, D., BRIEL, T., HERNER, A., TRAJKOVIC-ARSIC, M., SIPOS, B., LIOU, G. Y., STORZ, P., MURRAY, N. R., THREADGILL, D. W., SIBILIA, M., WASHINGTON, M. K., WILSON, C. L., SCHMID, R. M., RAINES, E. W., CRAWFORD, H. C. & SIVEKE, J. T. 2012. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*, 22, 304-17.
- AVVAKUMOV, G. V., WALKER, J. R., XUE, S., ALLALI-HASSANI, A., ASINAS, A., NAIR, U. B., FANG, X., ZUO, X., WANG, Y. X., WILKINSON, K. D. & DHE-PAGANON, S. 2012. Two ZnF-UBP domains in isopeptidase T (USP5). *Biochemistry*, 51, 1188-98.
- BARDEESY, N., CHENG, K. H., BERGER, J. H., CHU, G. C., PAHLER, J., OLSON, P., HEZEL, A. F., HORNER, J., LAUWERS, G. Y., HANAHAN, D. & DEPINHO, R. A. 2006. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev*, 20, 3130-46.
- BARTHOLOMEUSZ, G. A., TALPAZ, M., KAPURIA, V., KONG, L. Y., WANG, S., ESTROV, Z., PRIEBE, W., WU, J. & DONATO, N. J. 2007. Activation of a novel Bcr/Abl destruction pathway by WP1130 induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*, 109, 3470-8.
- BERLIN, J. D., CATALANO, P., THOMAS, J. P., KUGLER, J. W., HALLER, D. G. & BENSON, A. B. 3RD 2002. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol*, 20, 3270-5.
- BERNARDS, R., BRUMMELKAMP, T. R. & BEIJERSBERGEN, R. L. 2006. shRNA libraries and their use in cancer genetics. *Nat Methods*, 3, 701-6.
- BERNS, K., HIJMANS, E. M., MULLENDERS, J., BRUMMELKAMP, T. R., VELDS, A., HEIMERIKX, M., KERKHOVEN, R. M., MADIREDDO, M., NIJKAMP, W., WEIGELT, B., AGAMI, R., GE, W., CAVET, G., LINSLEY, P. S., BEIJERSBERGEN, R. L. & BERNARDS, R. 2004. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, 428, 431-7.
- BOETTCHER, M., FREDEBOHM, J., MOGHADDAS GHOLAMI, A., HACHMO, Y., DOTAN, I., CANAANI, D. & HOHEISEL, J. D. 2010. Decoding pooled RNAi screens by means of barcode tiling arrays. *BMC Genomics*, 11, 7.
- BOETTCHER, M. & HOHEISEL, J. D. 2010. Pooled RNAi Screens - Technical and Biological Aspects. *Curr Genomics*, 11, 162-7.

- BONNET, J., ROMIER, C., TORA, L. & DEVYS, D. 2008. Zinc-finger UBPs: regulators of deubiquitylation. *Trends Biochem Sci*, 33, 369-75.
- BORG, A., SANDBERG, T., NILSSON, K., JOHANNSSON, O., KLINKER, M., MASBACK, A., WESTERDAHL, J., OLSSON, H. & INGVAR, C. 2000. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1260-6.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRUGGE, W. R., LAUWERS, G. Y., SAHANI, D., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C. & WARSHAW, A. L. 2004. Cystic neoplasms of the pancreas. *N Engl J Med*, 351, 1218-26.
- BRUMMELKAMP, T. R. & BERNARDS, R. 2003. New tools for functional mammalian cancer genetics. *Nat Rev Cancer*, 3, 781-9.
- BUTZ, J., WICKSTROM, E. & EDWARDS, J. 2003. Characterization of mutations and loss of heterozygosity of p53 and K-ras2 in pancreatic cancer cell lines by immobilized polymerase chain reaction. *BMC Biotechnol*, 3, 11.
- CAPLEN, N. J., PARRISH, S., IMANI, F., FIRE, A. & MORGAN, R. A. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9742-7.
- CARMELL, M. A. & HANNON, G. J. 2004. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 214-8.
- CASCINU, S., FALCONI, M., VALENTINI, V., JELIC, S. & GROUP, E. G. W. 2010. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 21 Suppl 5, v55-8.
- CASEY, G., YAMANAKA, Y., FRIESS, H., KOBRIN, M. S., LOPEZ, M. E., BUCHLER, M., BEGER, H. G. & KORC, M. 1993. p53 mutations are common in pancreatic cancer and are absent in chronic pancreatitis. *Cancer Lett*, 69, 151-60.
- COLLAND, F., FORMSTECHE, E., JACQ, X., REVERDY, C., PLANQUETTE, C., CONRATH, S., TROUPLIN, V., BIANCHI, J., AUSHEV, V. N., CAMONIS, J., CALABRESE, A., BORG-CAPRA, C., SIPPL, W., COLLURA, V., BOISSY, G., RAIN, J. C., GUEDAT, P., DELANSORNE, R. & DAVIET, L. 2009. Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells. *Mol Cancer Ther*, 8, 2286-95.
- COWAN, R. W. & MAITRA, A. 2014. Genetic progression of pancreatic cancer. *Cancer J*, 20, 80-4.
- DAVALOS, V., SUAREZ-LOPEZ, L., CASTANO, J., MESSENT, A., ABASOLO, I., FERNANDEZ, Y., GUERRA-MORENO, A., ESPIN, E., ARMENGOL, M., MUSULEN, E., ARIZA, A., SAYOS, J., ARANGO, D. & SCHWARTZ, S., JR. 2012. Human SMC2 protein, a core subunit of human condensin complex, is a novel transcriptional target of the WNT signaling pathway and a new therapeutic target. *J Biol Chem*, 287, 43472-81.
- DAYAL, S., SPARKS, A., JACOB, J., ALLENDE-VEGA, N., LANE, D. P. & SAVILLE, M. K. 2009. Suppression of the deubiquitinating enzyme USP5 causes the accumulation of unanchored polyubiquitin and the activation of p53. *J Biol Chem*, 284, 5030-41.

- DEER, E. L., GONZALEZ-HERNANDEZ, J., COURSEN, J. D., SHEA, J. E., NGATIA, J., SCAIFE, C. L., FIRPO, M. A. & MULVIHILL, S. J. 2010. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39, 425-35.
- DEVERAUX, Q., USTRELL, V., PICKART, C. & RECHSTEINER, M. 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*, 269, 7059-61.
- DUBRIDGE, R. B., TANG, P., HSIA, H. C., LEONG, P. M., MILLER, J. H. & CALOS, M. P. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, 7, 379-87.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8.
- ELBASHIR, S. M., MARTINEZ, J., PATKANIOWSKA, A., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2001b. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 20, 6877-88.
- ELETR, Z. M. & WILKINSON, K. D. 2014. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 114-28.
- ELSASSER, H. P., LEHR, U., AGRICOLA, B. & KERN, H. F. 1992. Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 61, 295-306.
- FANG, B. 2014. Development of synthetic lethality anticancer therapeutics. *J Med Chem*, 57, 7859-73.
- FAZZIO, T. G. & PANNING, B. 2010. Condensin complexes regulate mitotic progression and interphase chromatin structure in embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 188, 491-503.
- FEIG, C., GOPINATHAN, A., NEESSE, A., CHAN, D. S., COOK, N. & TUVESON, D. A. 2012. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*, 18, 4266-76.
- FILIPOWICZ, W. 2005. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, 122, 17-20.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- GREGORY, R. I., CHENDRIMADA, T. P., COOCH, N. & SHIEKHATTAR, R. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123, 631-40.
- GRIESMANN, H., RIPKA, S., PRALLE, M., ELLENRIEDER, V., BAUMGART, S., BUCHHOLZ, M., PILARSKY, C., AUST, D., GRESS, T. M. & MICHL, P. 2013. WNT5A-NFAT signaling mediates resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Neoplasia*, 15, 11-22.
- HAERING, C. H., SCHOFFNEGGER, D., NISHINO, T., HELMHART, W., NASMYTH, K. & LOWE, J. 2004. Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell*, 15, 951-64.
- HAM, M. F., TAKAKUWA, T., RAHADIANI, N., TRESNASARI, K., NAKAJIMA, H. & AOZASA, K. 2007. Condensin mutations and abnormal

- chromosomal structures in pyothorax-associated lymphoma. *Cancer Sci*, 98, 1041-7.
- HAMMOND, S. M., BOETTCHER, S., CAUDY, A. A., KOBAYASHI, R. & HANNON, G. J. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293, 1146-50.
- HANNON, G. J. & ROSSI, J. J. 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, 431, 371-8.
- HARTWELL, L. H., SZANKASI, P., ROBERTS, C. J., MURRAY, A. W. & FRIEND, S. H. 1997. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science*, 278, 1064-8.
- HARVEY, S. H., KRIEN, M. J. & O'CONNELL, M. J. 2002. Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins, a family of conserved ATPases. *Genome Biol*, 3, REVIEWS3003.
- HEALE, J. T., BALL, A. R., JR., SCHMIESING, J. A., KIM, J. S., KONG, X., ZHOU, S., HUDSON, D. F., EARNSHAW, W. C. & YOKOMORI, K. 2006. Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair. *Mol Cell*, 21, 837-48.
- HERRMANN, R., BODOKY, G., RUHSTALLER, T., GLIMELIUS, B., BAJETTA, E., SCHULLER, J., SALETTI, P., BAUER, J., FIGER, A., PESTALOZZI, B., KOHNE, C. H., MINGRONE, W., STEMMER, S. M., TAMAS, K., KORNEK, G. V., KOEBERLE, D., CINA, S., BERNHARD, J., DIETRICH, D., SCHEITHAUER, W., SWISS GROUP FOR CLINICAL CANCER, R. & CENTRAL EUROPEAN COOPERATIVE ONCOLOGY, G. 2007. Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*, 25, 2212-7.
- HICKE, L., SCHUBERT, H. L. & HILL, C. P. 2005. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 610-21.
- HIDALGO, M. 2010. Pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 362, 1605-17.
- HINGORANI, S. R., WANG, L., MULTANI, A. S., COMBS, C., DERAMAUDT, T. B., HRUBAN, R. H., RUSTGI, A. K., CHANG, S. & TUVESON, D. A. 2005. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7, 469-83.
- HIRANO, M., ANDERSON, D. E., ERICKSON, H. P. & HIRANO, T. 2001. Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *EMBO J*, 20, 3238-50.
- HIRANO, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 311-22.
- HRUBAN, R. H., MAITRA, A. & GOGGINS, M. 2008. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol*, 1, 306-16.
- HRUBAN, R. H., MAITRA, A., KERN, S. E. & GOGGINS, M. 2007. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 36, 831-49, vi.
- HUTH, J., BUCHHOLZ, M., KRAUS, J. M., MOLHAVE, K., GRADINARU, C., V WICHERT, G., GRESS, T. M., NEUMANN, H. & KESTLER, H. A. 2011. TimeLapseAnalyzer: multi-target analysis for live-cell imaging and time-lapse microscopy. *Comput Methods Programs Biomed*, 104, 227-34.
- HWANG, R. F., MOORE, T., ARUMUGAM, T., RAMACHANDRAN, V., AMOS, K. D., RIVERA, A., JI, B., EVANS, D. B. & LOGSDON, C. D. 2008.

- Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res*, 68, 918-26.
- IOZZO, R. V., EICHSTETTER, I. & DANIELSON, K. G. 1995. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. *Cancer Res*, 55, 3495-9.
- IWAMURA, T., KATSUKI, T. & IDE, K. 1987. Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. *Jpn J Cancer Res*, 78, 54-62.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
- JI, B., TSOU, L., WANG, H., GAISER, S., CHANG, D. Z., DANILUK, J., BI, Y., GROTE, T., LONGNECKER, D. S. & LOGSDON, C. D. 2009. Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. *Gastroenterology*, 137, 1072-82, 1082 e1-6.
- KAPURIA, V., PETERSON, L. F., FANG, D., BORNMANN, W. G., TALPAZ, M. & DONATO, N. J. 2010. Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Res*, 70, 9265-76.
- KHVOROVA, A., REYNOLDS, A. & JAYASENA, S. D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 209-16.
- KIM, D. H., BEHLKE, M. A., ROSE, S. D., CHANG, M. S., CHOI, S. & ROSSI, J. J. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*, 23, 222-6.
- KIMURA, K., HIRANO, M., KOBAYASHI, R. & HIRANO, T. 1998. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science*, 282, 487-90.
- KONG, X., STEPHENS, J., BALL, A. R., JR., HEALE, J. T., NEWKIRK, D. A., BERNIS, M. W. & YOKOMORI, K. 2011. Condensin I recruitment to base damage-enriched DNA lesions is modulated by PARP1. *PLoS One*, 6, e23548.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAMMENS, A., SCHELE, A. & HOPFNER, K. P. 2004. Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases. *Curr Biol*, 14, 1778-82.
- LEJEUNE, S., HUGUET, E. L., HAMBY, A., POULSOM, R. & HARRIS, A. L. 1995. Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res*, 1, 215-22.
- LEVY, L. & HILL, C. S. 2005. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF- β) target genes and distinguishes TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol*, 25, 8108-25.
- LI, D., XIE, K., WOLFF, R. & ABBRUZZESE, J. L. 2004. Pancreatic cancer. *Lancet*, 363, 1049-57.
- LIANG, H., CHEN, Q., COLES, A. H., ANDERSON, S. J., PIHAN, G., BRADLEY, A., GERSTEIN, R., JURECIC, R. & JONES, S. N. 2003. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell*, 4, 349-60.

- LIEBER, M., MAZZETTA, J., NELSON-REES, W., KAPLAN, M. & TODARO, G. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*, 15, 741-7.
- LIU, J., CARMELL, M. A., RIVAS, F. V., MARSDEN, C. G., THOMSON, J. M., SONG, J. J., HAMMOND, S. M., JOSHUA-TOR, L. & HANNON, G. J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305, 1437-41.
- LOGAN, C. Y. & NUSSE, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.
- LOHR, M., MAISONNEUVE, P. & LOWENFELS, A. B. 2000. K-Ras mutations and benign pancreatic disease. *Int J Pancreatol*, 27, 93-103.
- LOSADA, A. & HIRANO, T. 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev*, 19, 1269-87.
- MAITRA, A., FUKUSHIMA, N., TAKAORI, K. & HRUBAN, R. H. 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol*, 12, 81-91.
- MALVEZZI, M., BERTUCCIO, P., LEVI, F., LA VECCHIA, C. & NEGRI, E. 2013. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol*, 24, 792-800.
- MEISTER, G., LANDTHALER, M., PATKANIOWSKA, A., DORSETT, Y., TENG, G. & TUSCHL, T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15, 185-97.
- MEISTER, G. & TUSCHL, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343-9.
- MELBY, T. E., CIAMPAGLIO, C. N., BRISCOE, G. & ERICKSON, H. P. 1998. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol*, 142, 1595-604.
- MICHL, P. & GRESS, T. M. 2013. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut*, 62, 317-26.
- MILAS, L., HIRATA, H., HUNTER, N. & PETERS, L. J. 1988. Effect of radiation-induced injury of tumor bed stroma on metastatic spread of murine sarcomas and carcinomas. *Cancer Res*, 48, 2116-20.
- MONTAGNOLI, A., FIORE, F., EYTAN, E., CARRANO, A. C., DRAETTA, G. F., HERSHKO, A. & PAGANO, M. 1999. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev*, 13, 1181-9.
- MOORE, P. S., SIPOS, B., ORLANDINI, S., SORIO, C., REAL, F. X., LEMOINE, N. R., GRESS, T., BASSI, C., KLOPPPEL, G., KALTHOFF, H., UNGEFROREN, H., LOHR, M. & SCARPA, A. 2001. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch*, 439, 798-802.
- NAKAJIMA, S., LAN, L., WEI, L., HSIEH, C. L., RAPIC-OTRIN, V., YASUI, A. & LEVINE, A. S. 2014. Ubiquitin-specific protease 5 is required for the efficient repair of DNA double-strand breaks. *PLoS One*, 9, e84899.
- NEESSE, A., MICHL, P., FRESE, K. K., FEIG, C., COOK, N., JACOBETZ, M. A., LOLKEMA, M. P., BUCHHOLZ, M., OLIVE, K. P., GRESS, T. M. & TUVESON, D. A. 2011. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, 60, 861-8.
- NIESS, H., CAMAJ, P., RENNER, A., ISCHENKO, I., ZHAO, Y., KREBS, S., MYSLIWIETZ, J., JACKEL, C., NELSON, P. J., BLUM, H., JAUCH, K. W., ELLWART, J. W. & BRUNS, C. J. 2014. Side population cells of

- pancreatic cancer show characteristics of cancer stem cells responsible for resistance and metastasis. *Target Oncol*.
- NIJMAN, S. M. 2011. Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Lett*, 585, 1-6.
- OETTLE, H., RICHARDS, D., RAMANATHAN, R. K., VAN LAETHEM, J. L., PEETERS, M., FUCHS, M., ZIMMERMANN, A., JOHN, W., VON HOFF, D., ARNING, M. & KINDLER, H. L. 2005. A phase III trial of pemetrexed plus gemcitabine versus gemcitabine in patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol*, 16, 1639-45.
- OHUCHIDA, K., MIZUMOTO, K., MURAKAMI, M., QIAN, L. W., SATO, N., NAGAI, E., MATSUMOTO, K., NAKAMURA, T. & TANAKA, M. 2004. Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer Res*, 64, 3215-22.
- OLIVE, K. P., JACOBETZ, M. A., DAVIDSON, C. J., GOPINATHAN, A., MCINTYRE, D., HONESS, D., MADHU, B., GOLDGRABEN, M. A., CALDWELL, M. E., ALLARD, D., FRESE, K. K., DENICOLA, G., FEIG, C., COMBS, C., WINTER, S. P., IRELAND-ZECCHINI, H., REICHELT, S., HOWAT, W. J., CHANG, A., DHARA, M., WANG, L., RUCKERT, F., GRUTZMANN, R., PILARSKY, C., IZERADJENE, K., HINGORANI, S. R., HUANG, P., DAVIES, S. E., PLUNKETT, W., EGORIN, M., HRUBAN, R. H., WHITEBREAD, N., MCGOVERN, K., ADAMS, J., IACOBUZIO-DONAHUE, C., GRIFFITHS, J. & TUVESON, D. A. 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 324, 1457-61.
- OLSON, D. J. & GIBO, D. M. 1998. Antisense wnt-5a mimics wnt-1-mediated C57MG mammary epithelial cell transformation. *Exp Cell Res*, 241, 134-41.
- OLSON, D. J., OSHIMURA, M., OTTE, A. P. & KUMAR, R. 1998. Ectopic expression of wnt-5a in human renal cell carcinoma cells suppresses in vitro growth and telomerase activity. *Tumour Biol*, 19, 244-52.
- ONO, T., LOSADA, A., HIRANO, M., MYERS, M. P., NEUWALD, A. F. & HIRANO, T. 2003. Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*, 115, 109-21.
- OVA, H., KESSLER, B. M., ROLAN, U., GALARDY, P. J., PLOEGH, H. L. & MASUCCI, M. G. 2004. Activity-based ubiquitin-specific protease (USP) profiling of virus-infected and malignant human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2253-8.
- OVERBEEK, P. A. 2011. Direct Data Submission for Overbeek Lentiviral Transgenic Lines. . *MGI Direct Data Submission*.
- PAL, A., YOUNG, M. A. & DONATO, N. J. 2014. Emerging potential of therapeutic targeting of ubiquitin-specific proteases in the treatment of cancer. *Cancer Res*, 74, 4955-66.
- PATEL, M. N., HALLING-BROWN, M. D., TYM, J. E., WORKMAN, P. & AL-LAZIKANI, B. 2013. Objective assessment of cancer genes for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 35-50.
- POPLIN, E., FENG, Y., BERLIN, J., ROTHENBERG, M. L., HOCHSTER, H., MITCHELL, E., ALBERTS, S., O'DWYER, P., HALLER, D., CATALANO, P., CELLA, D. & BENSON, A. B., 3RD 2009. Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate

- infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*, 27, 3778-85.
- POTU, H., PETERSON, L. F., PAL, A., VERHAEGEN, M., CAO, J., TALPAZ, M. & DONATO, N. J. 2014. Usp5 links suppression of p53 and FAS levels in melanoma to the BRAF pathway. *Oncotarget*, 5, 5559-69.
- RAASI, S., VARADAN, R., FUSHMAN, D. & PICKART, C. M. 2005. Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 708-14.
- RANA, T. M. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 23-36.
- REAL, F. X. 2003. A "catastrophic hypothesis" for pancreas cancer progression. *Gastroenterology*, 124, 1958-64.
- REAL, F. X., CIBRIAN-UHALTE, E. & MARTINELLI, P. 2008. Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. *Gastroenterology*, 135, 724-8.
- REYES-TURCU, F. E., SHANKS, J. R., KOMANDER, D. & WILKINSON, K. D. 2008. Recognition of polyubiquitin isoforms by the multiple ubiquitin binding modules of isopeptidase T. *J Biol Chem*, 283, 19581-92.
- ROCHA LIMA, C. M., GREEN, M. R., ROTCHE, R., MILLER, W. H., JR., JEFFREY, G. M., CISAR, L. A., MORGANTI, A., ORLANDO, N., GRUIA, G. & MILLER, L. L. 2004. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. *J Clin Oncol*, 22, 3776-83.
- SAITOH, T. & KATOH, M. 2002. Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer: up-regulation of WNT5A by TNFalpha in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells. *Int J Mol Med*, 10, 345-9.
- SAVILLE, M. K., SPARKS, A., XIRODIMAS, D. P., WARDROP, J., STEVENSON, L. F., BOURDON, J. C., WOODS, Y. L. & LANE, D. P. 2004. Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes Ubch5B/C in vivo. *J Biol Chem*, 279, 42169-81.
- SCARLETT, C. J., SALISBURY, E. L., BIANKIN, A. V. & KENCH, J. 2011. Precursor lesions in pancreatic cancer: morphological and molecular pathology. *Pathology*, 43, 183-200.
- SCHLABACH, M. R., LUO, J., SOLIMINI, N. L., HU, G., XU, Q., LI, M. Z., ZHAO, Z., SMOGORZEWSKA, A., SOWA, M. E., ANG, X. L., WESTBROOK, T. F., LIANG, A. C., CHANG, K., HACKETT, J. A., HARPER, J. W., HANNON, G. J. & ELLEDGE, S. J. 2008. Cancer proliferation gene discovery through functional genomics. *Science*, 319, 620-4.
- SCHLEIFFER, A., KAITNA, S., MAURER-STROH, S., GLOTZER, M., NASMYTH, K. & EISENHABER, F. 2003. Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol Cell*, 11, 571-5.
- SCHUMACHER, G., KATAOKA, M., ROTH, J. A. & MUKHOPADHYAY, T. 1999. Potent antitumor activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 5, 493-9.
- SCHWARZ, D. S., HUTVAGNER, G., DU, T., XU, Z., ARONIN, N. & ZAMORE, P. D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115, 199-208.

- SEUFFERLEIN, T., BACHET, J. B., VAN CUTSEM, E., ROUGIER, P. & GROUP, E. G. W. 2012. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 23 Suppl 7, vii33-40.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*.
- SIOLAS, D., LERNER, C., BURCHARD, J., GE, W., LINSLEY, P. S., PADDISON, P. J., HANNON, G. J. & CLEARY, M. A. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol*, 23, 227-31.
- SLUPPHAUG, G., KAVLI, B. & KROKAN, H. E. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 531, 231-51.
- SONG, J. J., SMITH, S. K., HANNON, G. J. & JOSHUA-TOR, L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305, 1434-7.
- STOMMEL, J. M. & WAHL, G. M. 2004. Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J*, 23, 1547-56.
- STRICK, T. R., KAWAGUCHI, T. & HIRANO, T. 2004. Real-time detection of single-molecule DNA compaction by condensin I. *Curr Biol*, 14, 874-80.
- TAN, M. H., NOWAK, N. J., LOOR, R., OCHI, H., SANDBERG, A. A., LOPEZ, C., PICKREN, J. W., BERJIAN, R., DOUGLASS, H. O., JR. & CHU, T. M. 1986. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest*, 4, 15-23.
- TSANG, C. K. & ZHENG, X. F. 2009. Opposing role of condensin and radiation-sensitive gene RAD52 in ribosomal DNA stability regulation. *J Biol Chem*, 284, 21908-19.
- TUSCHL, T., ZAMORE, P. D., LEHMANN, R., BARTEL, D. P. & SHARP, P. A. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, 13, 3191-7.
- VILA, M. R., LLORETA, J., SCHUSSLER, M. H., BERROZPE, G., WELT, S. & REAL, F. X. 1995. New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. *Lab Invest*, 72, 395-404.
- VOGELSTEIN, B., PAPADOPOULOS, N., VELCULESCU, V. E., ZHOU, S., DIAZ, L. A., JR. & KINZLER, K. W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*, 339, 1546-58.
- VONLAUFEN, A., JOSHI, S., QU, C., PHILLIPS, P. A., XU, Z., PARKER, N. R., TOI, C. S., PIROLA, R. C., WILSON, J. S., GOLDSTEIN, D. & APTE, M. V. 2008. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 68, 2085-93.
- WANG, Q., JIANG, H., PING, C., SHEN, R., LIU, T., LI, J., QIAN, Y., TANG, Y., CHENG, S., YAO, W. & WANG, L. 2014a. Exploring the Wnt Pathway-Associated LncRNAs and Genes Involved in Pancreatic Carcinogenesis Driven by Tp53 Mutation. *Pharm Res*.
- WANG, S., KOLLIPARA, R. K., SRIVASTAVA, N., LI, R., RAVINDRANATHAN, P., HERNANDEZ, E., FREEMAN, E., HUMPHRIES, C. G., KAPUR, P., LOTAN, Y., FAZLI, L., GLEAVE, M. E., PLYMATE, S. R., RAJ, G. V., HSIEH, J. T. & KITTLER, R. 2014b. Ablation of the oncogenic transcription factor ERG by deubiquitinase inhibition in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4251-6.

- WEERARATNA, A. T., JIANG, Y., HOSTETTER, G., ROSENBLATT, K., DURAY, P., BITTNER, M. & TRENT, J. M. 2002. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*, 1, 279-88.
- WILKINSON, K. D., VENTII, K. H., FRIEDRICH, K. L. & MULLALLY, J. E. 2005. The ubiquitin signal: assembly, recognition and termination. Symposium on ubiquitin and signaling. *EMBO Rep*, 6, 815-20.
- WONG, G. T., GAVIN, B. J. & MCMAHON, A. P. 1994. Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol*, 14, 6278-86.
- WOOD, J. L., LIANG, Y., LI, K. & CHEN, J. 2008. Microcephalin/MCPH1 associates with the Condensin II complex to function in homologous recombination repair. *J Biol Chem*, 283, 29586-92.
- WU, N. & YU, H. 2012. The Smc complexes in DNA damage response. *Cell Biosci*, 2, 5.
- XU, Z., POTHULA, S. P., WILSON, J. S. & APTE, M. V. 2014. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World J Gastroenterol*, 20, 11216-29.
- YANAGISAWA, K., KOSAKA, A., IWAHANA, H., NAKANISHI, M. & TOMINAGA, S. 1999. Opposite regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during contact inhibition. *J Biochem*, 125, 36-40.
- ZAMORE, P. D., BARTEL, D. P., LEHMANN, R. & WILLIAMSON, J. R. 1999. The PUMILIO-RNA interaction: a single RNA-binding domain monomer recognizes a bipartite target sequence. *Biochemistry*, 38, 596-604.
- ZHENG, C., JIA, W., TANG, Y., ZHAO, H., JIANG, Y. & SUN, S. 2012. Mesothelin regulates growth and apoptosis in pancreatic cancer cells through p53-dependent and -independent signal pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 84.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Auflistung der verwendeten Geräte	13
Tabelle 2-2 Auflistung der verwendeten Chemikalien und sonstige Reagenzien.....	14
Tabelle 2-3 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 2-4 Auflistung der verwendeten Kits	18
Tabelle 2-5 Auflistung der verwendeten Antikörper	18
Tabelle 2-6 Auflistung der verwendeten Enzyme	19
Tabelle 2-7 Auflistung der verwendeten Primersequenzen von Biomern (Ulm, Deutschland)	20
Tabelle 2-8 Auflistung der siRNA Sequenzen von Biomern (Ulm, Deutschland).....	21
Tabelle 2-9 Auflistung der Sequenzen für die Klonierung von Biomern (Ulm, Deutschland)	21
Tabelle 2-10 Ursprung der Zelllinien	22
Tabelle 2-11 Zusammensetzung des Ladepuffer	23
Tabelle 2-12 Zusammensetzung der Puffer für Enzyme	23
Tabelle 2-13 Zusammensetzung der RF Puffer für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	23
Tabelle 2-14 Zusammensetzung der Solubilisierungslösung.....	24
Tabelle 2-15 Zusammensetzung des Lysepuffers und der Phosphataseinhibitoren	24
Tabelle 2-16 Zusammensetzung Trenngel.....	25
Tabelle 2-17 Zusammensetzung Sammelgel	25
Tabelle 2-18 Zusammensetzung der 10x Westernblotpuffer und Ladepuffer	25
Tabelle 2-19 Zusammensetzung der 1x Westernblotpuffer	25
Tabelle 3-1: Realtime Cyclor Programm zur Bestimmung des mRNA Levels.....	31
Tabelle 4-1 Liste der potentiellen Kandidatengene	41

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Entstehung des invasiven PDAC aus gesundem Pankreasgewebe über die PanIN-Vorstufen.....	3
Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der RNA Interferenz	5
Abbildung 1-3 schematische Darstellung des gepoolten RNAi-Screen. (Quelle: verändert nach Boettcher and Hoheisel, 2010)	6
Abbildung 1-4: Aufbau und Funktion der Condensin-Komplexe	8
Abbildung 1-5 Darstellung der USP5-Struktur mit den verschiedenen Domänen und der Ubiquitinbindung.	11
Abbildung 2-1 Darstellung des verwendeten pLKO-Tet-On Vektors.....	22
Abbildung 4-1 Schematische Darstellung der Identifizierung der Kandidatengenene....	40
Abbildung 4-2 Expression von <i>AHCYL1</i> , <i>PFAS</i> , <i>RAE TRIP13</i> , <i>USP5</i> , <i>GSTP1</i> und <i>SMC2</i> in primären humanen Gewebeproben.....	42
Abbildung 4-3 Expression von <i>AHCYL1</i> , <i>PFAS</i> , <i>RAE TRIP13</i> , <i>USP5</i> , <i>GSTP1</i> und <i>SMC2</i> in Zelllinien.....	43
Abbildung 4-4 <i>Knockdown</i> von <i>SMC2</i> führt zur Reduktion der Proliferation und Vitalität von Pankreaskarzinomzelllinien	45
Abbildung 4-5 in HEK293 führte die Repression von <i>SMC2</i> zu keiner signifikanten Änderung der Proliferation oder der Zellvitalität	46
Abbildung 4-6 Die Hemmung der <i>SMC2</i> -Expression in PaTu8988T- und Panc-1-Zellen führt zu verminderten Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum	47
Abbildung 4-7 Der <i>SMC2-Knockdown</i> hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von PaTu8988T-Zellen	48
Abbildung 4-8 Der <i>SMC2-Knockdown</i> führte zu einem moderaten Einfluss auf den Zellzyklus.....	49
Abbildung 4-9 <i>SMC2-Knockdown</i> induziert Apoptose durch DNA-Doppelstrangbrüche	50
Abbildung 4-10 <i>WNT5A</i> reguliert <i>SMC2</i> auf mRNA-Ebene	51
Abbildung 4-11 Im Xenograft Mausmodell mit induzierbaren PaTu8988T-Klonen waren keine signifikanten Wachstumsunterschiede durch <i>SMC2</i> messbar.....	52
Abbildung 4-12 Der <i>Knockdown</i> von <i>USP5</i> führt zur Reduktion der Proliferation und Vitalität von Pankreaskarzinomzelllinien	54
Abbildung 4-13 Die Repression von <i>USP5</i> führte in HEK293-Zellen zu einer Veränderten Proliferationsrate und Zellvitalität	55

Abbildung 4-14 Der <i>USP5 Knockdown</i> hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von PaTu8988T-Zellen, aber er vermindert die Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum.....	56
Abbildung 4-15 <i>USP5-Knockdown</i> beeinflusst den Zellzyklus.....	57
Abbildung 4-16 <i>USP5-Knockdown</i> induziert Apoptose durch Doppelstrangbrüche	58
Abbildung 4-17 <i>USP5-Knockdown</i> beeinflusst die Ubiquitinierung und führt zur Akkumulierung p27/CDKN1B in den Zellen.....	59
Abbildung 4-18 Die Abwesenheit von <i>USP5</i> stabilisiert eine modifizierte Form von p27/CDKN1B	60
Abbildung 4-19 Die Reduktion der vitalen Zellen nach dem <i>Knockdown</i> von <i>USP5</i> konnte durch die Repression von <i>p27/CDKN1B</i> aufgehoben werden	62
Abbildung 4-20 Stabile <i>USP5</i> Repression in PaTu8988T-Zellen führt zu einer signifikanten Wachstumshemmung im Xenograft-Mausmodell	63

10. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Ago	Argoprotein
AHCYL	Adenosylhomocysteinase-like
APS	Ammonium persulfat
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BER	base excision repair
BRAF	v-raf m,urine sarcoma viral oncogene homolog B
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl₂	Kalziumchlorid
CDKN	Cyclin-dependent kinase Inhibitor
cDNA	Komplementäre DNA
cm³	Kubikzentimeter
cMYC	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog ¹
CO₂	Kohlenstoffdioxid
ctrl	Unbehandelte Zellen
Cys	Cystein
d. h.	das heißt
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Tri-Phosphat
Doxy	Doxycycline
ds RNA	Doppelsträngige RNA
DSB	Double strand breaks
DTT	Dithiothreitol
DUB	deubiquitinierenden Enzyme
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylester)-N,N,N,N-tetraessigsäure
EPO	Experimental Pharmacology and Oncology
ERC	rDNA Ringstruktur
ERG	<i>erythroplast transformation- specific-related oncogene</i>
FCS	Fötales Kälber Serum
g	Erdbeschleunigung
Gly	Glycin
GSTP	Glutathione S-transferase pi
H₂O	Wasser
HBS	HEPES buffered saline
HCL	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPMN	Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien
kDa	Kilo Dalton
KPC	Kras-TP53-Cre
mA	Milliampere
MCN	muzinös-zystischen Neoplasien
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgSO₄	Magnesiumsulfat
miRNA	Micro RNA
ml	Milliliter
MnCl₂	Manganclorid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Na₃VO₄	Natrium Orthovanadat
Na₄P₂O₇	Natriumpyrophosphate
NADPH	Nikotinamadenindinukleotidphosphat
NFATc	Nuclear factor of activated T cells cytoplasmic, calcineurin dependent
Ng	Nanogramm
PACT	Interferon-Inducible Double Stranded RNA-Dependent Protein Kinase
PAL	Pyothorax assoziierten Lymphomen
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasms
PBS	Phospate-Buffered-Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion

PDAC	Dukales pankreatisches Adenokarzinom
Pdx	Pancreatic and duodenal homeobox
PFAS	Phosphoribosylformylglyciamidine synthase
pH2AX	Phosphoryliertes H2AX
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	Peroxidase
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RAE	Ribonucleic acid export
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RbCl	Rubidiumchlorid
rDNA	Ribosomale DNA
RE	<i>responsive element</i>
RISC	RNA induced-silencing complex
rlu/s	Relative light units per second
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RPLP0	ribosomale Protein, large, P0
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
SD	Standartabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	Short hairpin RNA
si ctrl	Non-silencing Kontrolle
siRISC	RNA-Protein-Komplex (siRNA – RISC)
siRNA	small interference RNA
SMC	Structural maintenance of Chromosomes
SSB	Single stand breaks
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TRBP	Trans-Activation-Responsive RNA-Binding Protein ²
TRIP	Thyroid hormone receptor interactor

Ub	Ubiquitin
USP	Ubiquitin specific peptidase
V	Volt
WNT	Wingless-type MMTV interaction site family

11. Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Johann Wolfgang Goethe -Universität Frankfurt am Main waren: Aßmus, Averhoff, Brüggemann, Bruls, Büchel, Doerr, Engels, Entian, Gaese, Gnatzy, Grez, Kleinod, Klusmann-Kolb, Kolbesen, Kössel, Müller, Oehlmann, Osiwacz, Piepenbring, Prinzinger, Russ, Sandmann, Schleucher, Schmidt, Schneider, Soppa, Starzinsk-Powitz, Süß, Tampe, Türkay, Volknand, von Kuskull-Döring, von Laer, Wiltschko, Wöhnert, Zimmermann, Zizka

12. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Thomas Gress, für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Abteilung Gastroenterologie anzufertigen.

Dr. Malte Buchholz möchte ich herzlich für die Gelegenheit danken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sowie für die gute Betreuung während der gesamten Zeit. Außerdem möchte ich mich für das offene Ohr für alle Belange, das vermittelte Wissen, die vielen Anregungen, sowie die konstruktive Kritik zu jeder Zeit bedanken, alles zusammen hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nicht zuletzt, danke ich auch für die Hilfestellung bei der Anfertigung dieses Manuskripts.

Ich bedanke mich außerdem bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Buchholz, den medizinischen Doktoranden Antje Hülsemann und Christin Häuser, der Bachelorstudentin Violetta Müller und bei den anderen Arbeitsgruppen, die alle zusammen ein herzliches Arbeitsklima und dadurch einen tollen Laboralltag schafften.

Mein besonderer Dank geht dabei an Harald Schmidt und Ramona Diels, die beide Ihr reiches Wissen mit mir teilten, mich die Kunst des Westernblots lehrten und immer unterstützend tätig waren. Melanie Sauer danke ich, für die Unterstützung bei den FACS Analysen und den lentiviralen Transduktionen. Danke an, Lisa Fiedler für die vielen kleinen Tipps und Tricks im Laboralltag und entschuldige ich mich für die vielen Nerven, die durch mich strapaziert wurden. Und nicht zu vergessen Danny Schumacher, die mir in den letzten Wochen im Kampf gegen das Böse zur Seite stand.

Bei Heidi Griesmann möchte ich mich für die konstruktiven Diskussionen und ebenso für die Hilfestellung bei der Anfertigung dieses Manuskripts bedanken.

Bei allen möchte ich mich für die gemeinsamen Unternehmungen bedanken, die dazu beitrugen, dass ich mich während meiner Zeit in Marburg sehr wohlfühlte.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die Unterstützung, die sie mir auch während meines Lebensweges haben zukommen lassen und für die Tatsache, dass sie mich bei all meinen Plänen immer unterstützen.

Mein allergrößter Dank gilt meinem Lebensgefährten Steffen Luft, der mich bedingungslos bei dieser Dissertation unterstützte. Danke dafür, dass du mich immer wieder aufgebaut und mir auch in schwierigeren Zeiten beigestanden hast. Dein Glauben trug mich durch die 3 Jahre. Danke für deine Liebe und dass du mich immer wieder erdest, wenn ich die Nerven verliere.